

**Einfluss einer vorhergehenden Influenza A Virus Infektion auf die
angeborene Immunität gegenüber der sekundären
Pneumokokkenpneumonie in humanem Lungengewebe**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Johanna Berg (M.Sc.)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
 2. Prof. Dr. Andreas Christian Hocke
 3. PD Dr. Daniel Drömann

Tag der Einreichung: 04.04.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2016

Zusammenfassung

Sekundäre bakterielle Infektionen im Verlauf oder in Folge einer Infektion mit Influenza A Viren (IAV) steigern oftmals die Schwere des Krankheitsverlaufes, was besonders während der IAV Pandemien von 1918, 1968 und 2009 deutlich wurde.

Genaue mechanistische Ursachen, welche dieser gesteigerten Kopathogenität zugrunde liegen wurden überwiegend in Tierversuchsmodellen adressiert und sind immunologisch unvollständig. Aufgrund organstruktureller und immunfunktioneller Speziesunterschiede ist ungewiss, inwieweit eine Übertragbarkeit der Daten zwischen Mensch und Maus besteht.

Fokus der Arbeit bildete die Analyse potentieller IAV assoziierter Änderungen der angeborenen Immunität, welche sekundäre Pneumokokkeninfektionen in humanem *ex vivo* Lungengewebe begünstigen. Dafür wurden zentrale Zyto - bzw. Chemokine als Reaktion auf Einzelinfektionen mit dem saisonalen IAV Pan/99(H3N2) sowie *Streptococcus pneumoniae* D39 mit denen subsequenter viral-bakteriellen Koinfektion verglichen.

Ausgelöst durch die antivirale Interferonantwort erfolgte die Reduktion der pneumokokkeninduzierten Bildung von IL-1 β und GM-CSF auf translationaler und transkriptioneller Ebene. Vermutlich beeinflussen Typ I und II Interferone die IL-1 β Bildung, welches über parakrine Wechselwirkungen an der GM-CSF Regulation beteiligt ist. Auf zellulärer Ebene verursachte IAV die Freisetzung von Typ I, II und III Interferonen aus primären humanen Alveolarepithelzellen vom Typ II. In humanen Alveolarmakrophagen unterdrückten Typ I und II Interferone die pneumokokkeninduzierte IL-1 β Freisetzung. Folglich unterblieb die IL-1 β -regulierte GM-CSF Sekretion aus Alveolarepithelzellen vom Typ II.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass influenzainduzierte Interferone durch die Unterdrückung der IL-1 β regulierten Bildung von GM-CSF in humanem Lungengewebe beitragen. Damit unterstützt sie das Verständnis immunologischer Faktoren, welche diesem Krankheitsbild im Menschen pathophysiologisch zugrunde liegen können.

Abstract

Secondary bacterial infections, which occur during or following an IAV infection, exaggerate the severity of the course of disease up to a lethal outcome, clearly recognizable during the fatal IAV pandemics from 1918, 1968 or 2009. Particular mechanisms underlying this exaggerated viral-bacterial copathogenicity were almost solely addressed using animal models and are immunologically incomplete. Due to structural and immunofunctional interspecies differences the transferability of data between human and mice remains indeterminate.

The study mainly purposed to investigate IAV associated modulations of innate immunity, which potentially facilitates secondary pneumococcal pneumonia in primary human *ex vivo* lung tissue. Hence secretion of central cyto- and chemokines initiated by single infection with the seasonal IAV Pan/99(H3N2) or the bacterium *Streptococcus pneumoniae* D39 were compared to subsequent viral-bacterial coinfection.

In context of an antiviral interferon response the pneumococcal induced translation and transcription of IL-1 β and GM-CSF were reduced. Probably type I and type II interferons affect generation of IL-1 β , which participates in the regulation of GM-CSF by paracrine interactions. On a cellular basis the infection of primary human alveolar epithelial cells type II (AECII) with IAV triggered the release of interferon type I, II and III. In human alveolar macrophages type I and II interferons suppressed the pneumococcal induced release of IL-1 β . Consequently, the IL-1 β regulated generation of GM-CSF in AECII was impeded.

The present study indicates, that influenza related induction of interferons suppresses the IL-1 β related release of GM-CSF in human lung tissue. Thereby it takes part in contributing to pathophysiological comprehension of immunological factors underlying this copathogenicity.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	2
1.1 Influenza Virus assoziierte sekundäre bakterielle Pneumonie	2
1.1.1 Historischer Rückblick	3
1.1.2 Tiermodelle zur Analyse Influenza Virus assoziierter bakterieller Pneumonien ..	5
1.2 Mikrobiologie virusassoziierter sekundärer bakterieller Pneumonien	6
1.2.1 Respiratorische Viren	6
1.2.2 Influenza A Virus	6
1.2.3 Bakterielle Erreger	8
1.2.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
1.3 Humaner Respirationstrakt	10
1.3.1 Aufbau und Funktion	10
1.3.2 Die Alveole	11
1.4 Mechanismen der viral-bakteriellen Kopathogenität	13
1.4.1 Prädisponierende Wirtsfaktoren für die sekundäre Pneumokokkenpneumonie infolge einer Influenza Virus Infektion	15
1.4.2 Influenza Virus induzierte Effekte auf den Wirt	16
1.4.3 Bakterielle Effekte auf das Immunsystem des Wirtes	25
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28

2.1.3	Chemikalien	29
2.1.4	Puffer und Lösungen	30
2.1.5	Medien und Zusätze	32
2.1.6	Antikörper	33
2.1.7	Enzyme.....	34
2.1.8	Reaktionssysteme und Kits	34
2.1.9	<i>Taqman</i> Sonden.....	35
2.1.10	Stimulanzen.....	35
2.1.11	Untersuchungsobjekte	36
2.1.12	Pathogene	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.2	Infektiologische Arbeiten mit Zell- und Lungenkulturen	41
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.4	Immunohistologie	52
2.3	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Etablierung eines Modells humaner <i>ex vivo</i> Lungengewebekulturen zur Analyse der Influenza A Virus assoziierten sekundären Pneumokokkenpneumonie	56
3.1.1	Pathogenwachstum in humanem Lungengewebe	56
3.1.2	Zytotoxizität in <i>ex vivo</i> koinfizierten Lungenkulturen.....	58
3.1.3	Histologische Analyse koinfizierter Lungenkulturen	59
3.2	Quantifizierung Influenza AVirus - und <i>S. pneumoniae</i> induzierter Zyto- und Chemokine	61
3.2.1	Pan/99(H3N2) induziert Typ I, II und III Interferone in humanen Lungenkulturen	61
3.2.2	Pan/99(H3N2) inhibiert die <i>S. pneumoniae</i> induzierte Freisetzung von IL-1 β und GM-CSF.....	63
3.3	Typ I und II Interferone wirken inhibierend auf die Freisetzung von IL-1 β und GM- CSF.....	64
3.4	IL-1 β regulierte Freisetzung von GM-CSF in humanen Lungenkulturen	66
3.5	Interferon blockiert Synthese von IL-1 β auf Transkriptionsebene	69

3.5.1	Pan/99(H3N2) verhindert Bildung <i>S. pneumoniae</i> induzierten pro-IL-1 β	69
3.5.2	Interferon unterdrückt Transkription von pro-IL-1 β mRNA	69
3.5.3	Interferon wirkt nicht auf die inflammasomregulierte Bildung von IL-18	71
3.6	Direkte Suppression der GM-CSF Freisetzung durch Interferon	72
3.7	Auswirkung der Koinfektion auf die Bildung der Cyclooxygenase-2	72
3.8	Zelluläre Interaktion der interferonvermittelten Blockade der Freisetzung von IL-1 β und GM-CSF	74
3.8.1	Phänotypische Charakterisierung isolierter primärer AM und AECII	74
3.8.2	Pan/99(H3N2) induziert Typ I, II und III Interferonsekretion in AECII	76
3.8.3	AECII sezernieren GM-CSF über von AM gebildetes IL-1 β	77
3.8.4	Interferonvermittelte Suppression der IL-1 β Bildung in primären AM	79
3.8.5	IL-1 β vermittelte Freisetzung von Zytokinen aus AECI-ähnlich	80
4	Diskussion	82
4.1	Charakteristik grundlegender Parameter des <i>ex vivo</i> Lungenkulturmodells zur Untersuchung der Influenza A Virus assoziierten sekundären Pneumokokkenpneumonie	83
4.2	Influenza A Virus verursachte Interferoninduktion in humanen Lungenkulturen	85
4.3	Differentielle Zytokinfreisetzung in humanen koinfizierten Lungenkulturen	87
4.4	Folgen der interferoninduzierte Suppression von IL-1 β und GM-CSF	88
4.5	IL-1 β regulierte Sekretion von GM-CSF in humanen Lungenkulturen	91
4.6	Ursachen der interferoninduzierten Blockade der IL-1 β Bildung in Lungenkulturen	92
4.7	Keine Beeinflussung der inflammasomregulierten Bildung von IL-18	93
4.8	Suppression der IL-1 β induzierten COX-2 in koinfiziertem Lungengewebe	95
4.9	Zelluläre Grundlagen	96
4.9.1	Immunreaktionen von AECII und AM	96
4.9.2	Unterschiede in der Immunantwort von AECI-ähnlich und AECII	99
4.10	Komplexität sekundärer bakterieller Infektionen	100
4.11	Vor- und Nachteile des humanen <i>ex vivo</i> Lungenmodells	102
4.12	Ausblick	105
	Literaturverzeichnis	108
	Anhang	135

Publikationen.....	138
Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Alveolarepithel
AEC	Alveolarepithelzelle (<i>alveolar epithelial cell</i>)
AECI	Alveolarepithelzelle vom Typ I
AECI-ähnlich	Alveolarepithel Typ I ähnliche Zellen
AECII	Alveolarepithelzelle vom Typ II
ALI	akutes Lungenversagen (<i>acute lung Injury</i>)
AM	Alveolarmakrophagen
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	ambulant erworbene Pneumonie (<i>community-acquired pneumonia</i>)
CD	Bezeichnungssystem von Differenzierungsantigenen
cfu	koloniebildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxy-ribonucleic acid</i>)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CSF2	koloniestimulierender Faktor 2 (<i>colony stimulating factor 2</i>)
Ct	Zyklusschwellenwert (<i>cycle threshold</i>)
DAMP	Gefahrassozierte molekulare Muster (<i>danger associated molecular pattern</i>)
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alia</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>)
HA	Hämagglutinin
HBSS	Hanks-gepufferte Salzlösung (<i>Hanks buffered saline solution</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse reddish peroxidase</i>)
IAV	Influenza A Virus
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β Rezeptor
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IV	Influenzavirus
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leuzinreiche Wiederholung (<i>leucin-rich repeat</i>)
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
M1	klassisch Makrophagenaktivierung
M2	alternative Makrophagenaktivierung
MARCO	Makrophagenrezeptor mit Kollagenstruktur (<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>)
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MyD88	Primäres Gen zur Myeloiddifferenzierung 88 (<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>)
n.s.	statistisch nicht signifikant
NA	Neuraminidase
NF κ B	nukleärer Faktor kappaB (<i>nuclear factor κB</i>)
NLRP3	NOD-ähnliche Rezeptorfamilie mit drei pyrinbindenden Domänen (<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>)
NOD	Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungs-Domäne (<i>nucleotid binding and oligomerisation domain</i>)
NS1	Nichtstrukturprotein 1
OD	Optische Dichte
p. i.	nach der Infektion (<i>post infection</i>)

PAFR	plättchenaktivierender Faktorrezeptor (<i>platelet-activating factor receptor</i>)
PAMP	pathogenassoziiertes molekulares Faktor (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
Pan/99	A/Panama/1999/2007
PB1-F2	basisches Polymeraseprotein 1-im 2. Leserahmen (<i>frame 2</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Lochbildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
PLY	Pneumolysin
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptor</i>)
pro-SP-C	pro-Surfactant Protein C
PTGS2	Prostaglandin Synthase 2
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (in Abbildungen)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
ST3	Serotyp 3
THY	Todd-Hewitt Bouillon mit Hefeextrakt (<i>Todd-Hewitt with yeast extract</i>)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPCK	N-(p-Toluenesulfonyl)-L-phenylalanyl Chloromethyl Ketone
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Formen viral-bakterieller Pneumonien.	5
Abbildung 2: Übersicht der unteren Atemwege bis zu den Alveolen.	11
Abbildung 3: Übersicht der terminalen respiratorischen Einheit.	12
Abbildung 4: Interaktionen zwischen Virus, Wirt und Bakterien während der Koinfektion.	14
Abbildung 5: Altersspezifische Verteilung schwerer Pneumonien während der IAV Pandemien von 1918/19 und 2009.	15
Abbildung 6: IV assoziierte Mechanismen gesteigerter Suszeptibilität gegenüber einer sekundären Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	20
Abbildung 7: Einfluss von GM-CSF auf die Differenzierung myeloider und mononukleärer Zellen.	23
Abbildung 8: Einfluss von GM-CSF auf die Differenzierung von Alveolarmakrophagen. .	24
Abbildung 9: Versuchsaufbau der Etablierung eines humanen <i>ex vivo</i> Lungenkultur- modells zur Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion.	45
Abbildung 10: Replikation des saisonalen IAV Pan/99 in <i>ex vivo</i> infizierten Lungenkulturen.	56
Abbildung 11: Wachstumsverhalten von <i>S. pneumoniae</i> ohne und in Abhängigkeit von IAV in <i>ex vivo</i> infizierten Lungenkulturen.	57
Abbildung 12: Zytotoxizität in <i>ex vivo</i> koinfizierten Lungenkulturen.	59
Abbildung 13: Immunhistologische Lokalisierung von IAV und <i>S. pneumoniae</i> in infiziertem humanem Lungengewebe.	60
Abbildung 14: IAV induzierte Interferonfreisetzung in Lungenkulturen.	62
Abbildung 15: Differentielle Sekretion von Zyto- und Chemokinen koinfizierter Lungenkulturen.	63
Abbildung 16: Einfluss von Interferon auf die <i>S. pneumoniae</i> bedingte Zytokinsekretion....	66
Abbildung 17: IL-1 β reguliert die GM-CSF Freisetzung in humanen Lungenkulturen.	67
Abbildung 18: Die <i>S. pneumoniae</i> induzierte Expressionskinetik von IL-1 β und GM-CSF erfolgt zeitlich versetzt.	68
Abbildung 19: Interferon hemmt Bildung der <i>S. pneumoniae</i> induzierten Bildung von pro-IL-1 β im Western Blot.	69
Abbildung 20: Einfluss der Interferone auf die Transkription <i>S. pneumoniae</i> induzierter Zytokine.	70

Abbildung 21: Die <i>S. pneumoniae</i> induzierte IL-18 Bildung bleibt unbeeinflusst von IAV.	71
Abbildung 22: Interferon wirkt auch direkt auf die Freisetzung von GM-CSF.	72
Abbildung 23: Einfluss IAV induzierter Interferone auf die Expression der COX-2 durch die veränderte Sekretion von IL-1 β .	73
Abbildung 24: Phänotypisierung isolierter AM und AECII mittels Immunfluoreszenz.	75
Abbildung 25: IAV induziert die Sekretion von Typ I, II und III Interferonen aus primären humanen AECII.	77
Abbildung 26: Die pneumokokkenbedingte Freisetzung von IL-1 β aus AM reguliert die Bildung von GM-CSF und COX-2 aus AECII.	78
Abbildung 27: Interferon unterdrückt die <i>S. pneumoniae</i> induzierte Freisetzung von IL-1 β aus AM.	80
Abbildung 28: IL-1 β induziert die Sekretion von GM-CSF, IL-8 und IL-6 aus humanen AECI-ähnlich.	81
Abbildung 29: Modell alveolärer Zellinteraktionen ausgelöst durch Zytokine der frühzeitigen Immunantwort während bakterien- und virusassoziierter sekundärer bakterieller Infektion.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	27
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 3: Chemikalien	29
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	30
Tabelle 5: Medien und Zusätze für MDCK-Zellen	32
Tabelle 6: Medien und Zusätze für Lungenkulturen	32
Tabelle 7: Medien und Zusätze für primäre AEC (AECII, AEC I-ähnlich)	33
Tabelle 8: Medien und Zusätze für isolierte AM	33
Tabelle 9: Medien und Zusätze für <i>S. pneumoniae</i>	33
Tabelle 10: Primäre Antikörper und Seren.....	33
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper	34
Tabelle 12: Enzyme.....	34
Tabelle 13: Reaktionssysteme und kommerzielle Kits	34
Tabelle 14: TaqMan Sonden	35
Tabelle 15: Stimulanzen.....	35
Tabelle 16: Verwendete Untersuchungsobjekte.....	36
Tabelle 17: Influenza A Virus	36
Tabelle 18: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
Tabelle 19: Versuchsaufbau zur Koinfektion humaner Lungenkulturen	44
Tabelle 20: DNase-Verdau	49
Tabelle 21: HI-RT Versuchsansatz	50
Tabelle 22: RT-Reaktionsprogramm im Thermocycler	50
Tabelle 23: <i>Real-Time</i> PCR Ansatz.....	51
Tabelle 24: <i>Real-Time</i> PCR Programm.....	51
Tabelle 25: Schritte der automatisierten Paraffineinbettung von Gewebeproben.....	53
Tabelle 26: Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeproben.....	54
Tabelle 27: Erweiterter Versuchsaufbau zur Koinfektion von Lungenproben unter Verwendung von IFN β und IFN γ	65

1 Einleitung

1.1 Influenza Virus assoziierte sekundäre bakterielle Pneumonie

Respiratorische Infektionskrankheiten werden in der Regel sowohl von viralen als auch bakteriellen Erregern verursacht. Unter diesen stellt die Pneumonie die schwerste Form dar und ist durch eine akute Entzündung des alveolären Lungenparenchyms charakterisiert (Fagon, 1993). Sie zählt weltweit immer noch zu den häufigsten Todesursachen bei Kindern und Erwachsenen (WHO, 2014).

Etwa ein Drittel der ambulant erworbenen Pneumonien (CAP) werden durch Viren ausgelöst, vornehmlich durch Inflenzaviren (IV), Respiratorische Synzytial-Viren (RSV), Parainflenzaviren und Rhinoviren (Ruuskanen, 2011; Rocha Neto, 2013). Aufgrund ihrer schnellen Transmission und der mit ihnen verbunden hohen Morbidität und Mortalität stellen Ausbrüche saisonaler und epidemischer IV Infektionen sowie unvorhersehbare Pandemien ein globales Gesundheitsrisiko dar (Taubenberger, 2008). Komplikationen einer IV Infektion, welche zumeist aus Vorerkrankungen wie Asthma, COPD oder kardiovaskulären Erkrankungen resultieren, können zu schweren primären Inflenzapneumonie führen (Taubenberger, 2008). Dennoch stellen, trotz der steigenden Verwendung von Antibiotika, bakterielle Infektionen die häufigsten Auslöser der CAP dar (Welte, 2006). Eine oft auftretende Komplikation von IV Infektionen sind sekundäre bakterielle Pneumonien. Diese lassen sich in die kombinierte viral-bakterielle Pneumonie und die Post-Inflenzapneumonie unterteilen (Abb. 1) (van der Sluijs, 2010). Mehrfach innerhalb des 20sten Jahrhunderts verursachten IV assoziierte sekundäre bakterielle Infektionen signifikante Gesundheitsprobleme, einhergehend mit einer hohen Letalität. *Post mortem* analysierte Lungenproben zeigten, dass etwa 95 % (McCullers, 2014) der Opfer der als „Spanische Grippe“ bezeichneten Influenza A Virus (IAV) Pandemie von 1918/19 eine bakterielle Infektionen aufwiesen (Taubenberger, 2008; Morens, 2008). Auch in den späteren IAV Pandemien von 1957 (Trotter, 1959) und 1968 (Bisno, 1971) verkomplizierten sekundäre bakterielle Infektionen den Krankheitsverlauf in etwa 40 % der untersuchten Fälle, was zu fulminanten Gesundheitszuständen der Betroffenen führte, welche mitunter fatal endeten (Kash, 2015). Obwohl auch während einer IAV Infektion prophylaktisch immer häufiger Antibiotika eingesetzt werden, wiesen auch während der IAV Pandemie von 2009 („Schweine Grippe“) erneut etwa $\frac{1}{3}$ der untersuchten Patientenproben eine zusätzliche bakterielle Infektion auf (Gill, 2010). Klinische Befunde zeigten, dass die betroffenen Patienten häufig an prädisponierenden Faktoren wie Übergewicht oder Herz-Kreislauf-erkrankungen litten (Gill, 2010).

Dabei geht die Gefahr einer virusassoziierten sekundären bakteriellen Pneumonie nicht nur von pandemischen, sondern auch von saisonalen IV aus. Zudem steigt das Risiko durch das Zusammenkommen neu auftretender IV Epidemien bzw. Pandemien infolge genetischer Veränderungen, verbunden mit der zunehmenden Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika sowie der gesteigerten Letalität, welche von IV assoziierten sekundären bakteriellen Infektionen ausgeht. In Anbetracht dieser Bedrohung ist es notwendig die molekularen Grundlagen der viral-bakteriellen Kopathogenität zu verstehen, um optimale klinische Ansätze entwickeln zu können. Viele Studien zeigten, dass es durch die vorhergehende IV Infektion zu einer dysfunktionalen angeborenen Immunabwehr gegenüber sekundären bakteriellen Erregern kam. So führte beispielsweise die sukzessiv viral-bakteriell Koinfektion von Mäusen zur übermäßigen Freisetzung von IL-10 und einer Fehlregulation von Neutrophilen und Makrophagen, was verglichen mit ausschließlich bakteriell infizierten Mäusen häufiger mit dem Tod endete (van der Sluijs, 2010). Doch erst auf Basis der Identifikation genauer molekularer Ursachen, welche solchen immunologischen Fehlregulationen zu Grunde liegen, können effektive prophylaktische und therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der Post-Influenzapneumonie erfolgen.

1.1.1 Historischer Rückblick

Bereits im 18ten Jahrhundert wurde das Auftreten von Koinfektionen viraler und bakterieller Erreger aufgrund unterschiedlicher Ausprägungsgrade der Pneumonie einhergehend mit pathophysiologischen Veränderungen bekannt (Morens, 2011). Später, 1803 beschrieb René T.H. Laennec anhand klinischer Beobachtungen und Autopsien eine Verbindung zwischen IV und der bakteriellen Pneumonie (Laennec, 1923 beschrieben in McCullers, 2006). Ernsthafte epidemiologische und klinische Nachforschungen diesbezüglich begannen jedoch erst mit dem Auftreten der „Spanischen Grippe“ im Jahr 1918, vornehmlich ausgeführt und dirigiert durch die Streitkräfte des 1. Weltkrieges (Brundage, 2007). Während dieser durch das IAV ausgelösten Pandemie (Subtyp H1N1) verstarben etwa 50 Millionen Menschen, überwiegend an sekundären bakteriellen Infektionen (Potter, 1998). Aufgrund des verheerenden Ausmaßes wurde in den Militärkrankenhäusern mehrerer Nationen, darunter die USA, Großbritannien, Neu Seeland und Australien nach Ursachen geforscht (Brundage, 2007). Experimentelle Studien zeigten zudem, dass Mäuse, Ratten und Meerschweinchen, welche mit ungefiltertem Sputum von IAV Patienten in Kontakt gebracht wurden, bakterielle Pneumonien entwickelten (Francis, 1945 beschrieben in McCullers, 2006). Daraus resultierend begann die Etablierung von Tiermodellen zur mechanistischen Analyse sekundärer bakterieller Infektionen. 1931

zeigte Shope, dass ein porzines IV Isolat erst nach Koinokulation mit *Haemophilus influenzae suis* schwere Pneumonien in Schweinen verursachte (Shope, 1931 beschrieben in McCullers 2006). Dieser Befund wurde 1945 auf das Mausmodell übertragen, zunächst unter Verwendung des mausadaptierten IAV Stammes Puerto Rico/8/1934 (PR8) vom Subtyp H1N1 (Francis, 1945 beschrieben in McCullers, 2006), der auch heute überwiegend zusammen mit Laborstämmen von *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*; Pneumokokken) im murinen Koinfektionsmodell verwendet wird (McCullers, 2002). Schnell zeigte sich eine Abhängigkeit des Verlaufes der Krankheit von der Dosis der verwendeten Erreger und dem zwischen beiden Infektionen liegendem Zeitfenster (Francis, 1945 beschrieben in McCullers 2006). Ausgehend von klinischen Fallstudien und Autopsieberichten von Opfern der „Spanischen Grippe“ wiesen schätzungsweise 95 % aller schwer Erkrankten bzw. Verstorbenen bakterielle Infektionen auf (Morens, 2008). Für die altersspezifische Verteilung von IV Infektionen untypisch waren neben Säuglingen und älteren Menschen auch vermehrt junge Erwachsene unter den Opfern zu finden (Morens, 2007). Während der IAV Pandemien von 1957 - 58 (Subtyp H2N2) und 1968 - 69 (Subtyp H3N2) resultierten etwa 40 % der Todesfälle aus bakteriellen Pneumonien, wobei viele der Opfer zusätzlich chronische Krankheiten aufwiesen (Trotter, 1959; Bisno, 1971). Dementgegen betraf der Großteil der Todesfälle während der 2009 aufgetretenen IAV (H1N1)-Pandemie erneut junge Erwachsene ohne jegliche chronische Beschwerden (Dawood, 2012). Das Ausmaß sekundärer bakterieller Infektionen während der Pandemie von 2009 ist nicht eindeutig geklärt, es liegen Studien vor, die von etwa 10 % ausgehen (Charu, 2011) wohingegen andere von etwa 25 - 50 % sprechen (Estenssoro, 2010; Shieh, 2010). Generell verringerten sich die Todesraten bakteriell verkomplizierter IAV Infektionen im Laufe des 20. Jahrhunderts bzw. konnten seit Beginn des 21. Jahrhunderts, trotz des immer stärkeren Einsatzes von Antibiotika und Gripeschutzimpfungen nicht verhindert werden.

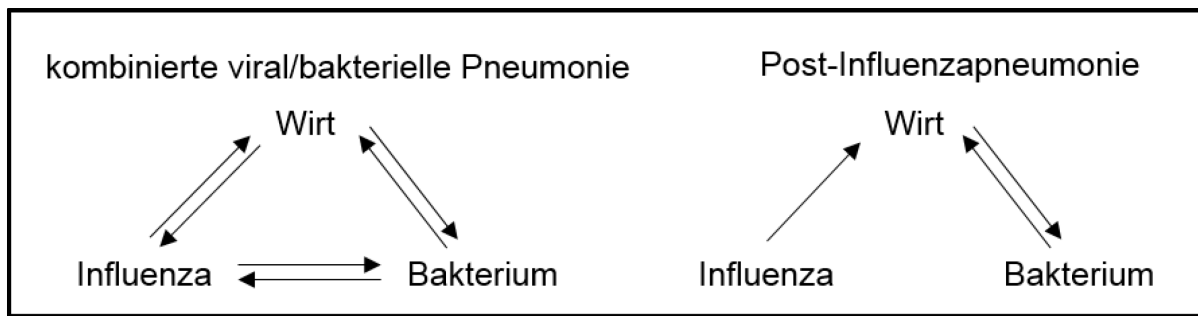


Abbildung 1: Formen viral-bakterieller Pneumonien.

Viral-bakterielle Pneumonien werden je nach dem zwischen den Einzelinfektionen liegendem Zeitfenster in die kombinierte viral/bakterielle Pneumonie und die Post-Influenzapneumonie unterteilt. In ersterer interagieren beide Erregerdomänen und der Wirt gleichzeitig miteinander, wohingegen bei der Post-Influenzapneumonie keine Viruspartikel mehr während der sekundären bakteriellen Infektion nachweisbar sind. Virusassoziierte Veränderungen des Wirtssystems bleiben während der bakteriellen Infektion bestehen und beeinträchtigen die antibakterielle Wirtsabwehr. (verändert nach van der Sluijs, 2010).

1.1.2 Tiermodelle zur Analyse Influenza Virus assoziierter bakterieller Pneumonien

Obgleich die Möglichkeit deskriptiver klinischer Studien und der *post mortem* Analyse des Lungengewebes von Opfern IV assoziierter sekundärer bakterieller Pneumonien besteht, sind mechanistische Untersuchungen im Menschen nur eingeschränkt bzw. in tiefgreifender Weise aus ethischen Gründen undenkbar. Da sich die klinische Symptomatik viraler und bakterieller Pneumonien im Anfangsstadium der Krankheit kaum unterscheidet, gestaltet sich zudem die frühzeitige Identifikation einer Koinfektion bei Erkrankten als schwierig (van der Sluijs, 2010). Aus diesem Grund stammt der Großteil experimenteller Daten aus Tierversuchsmodellen, wobei das Mausmodell das am meisten verbreitete ist (Ballinger, 2010; Metzger, 2013). Trotz zahlreicher organstruktureller und immunfunktioneller Unterschiede verläuft die IAV Infektion zwischen Mensch und Maus zeitlich sehr ähnlich (Metzger, 2013). Nach etwa 3 – 5 Tagen erreicht das in humanen Alveolarepithelzellen (AEC) replizierende IAV maximale virale Titer, welche im Falle einer milden bis moderaten Infektion nach ca. sieben Tagen aufgelöst wird (Jakab, 1981). Nach etwa 15 - 18 Tagen sind keinerlei virale Antigene mehr zu detektieren, trotz allem scheinen geringe Spuren davon für längere Zeit im Wirt zu persistieren (McGill, 2009). Im Menschen kommt es etwa eine Woche nach der primären IAV Infektion verstärkt zum Auftreten sekundärer bakterieller Infektionen. Unter experimentellen Bedingungen wird daher die bakterielle Infektion in Mäusen ebenfalls überwiegend nach etwa sieben Tagen gesetzt (LeVine, 2001; Sun, 2008; Stegemann, 2009). Prinzipiell wird zwischen zwei Typen experimenteller Studien unterschieden, der kombiniert viral/bakteriellen Pneumonie, bei der die bakterielle Infektion spätestens sieben Tage nach der IV Infektion erfolgt (LeVine, 2001; McCullers, 2006; Pittet, 2010) und der sogenannten Post-Influenzapneumonie, bei der keine

viralen Antigene mehr nachweisbar sind (etwa 15 - 35 Tage nach IV Infektion) bevor die Bakterien appliziert werden (van der Sluijs, 2004; Didierlaurent, 2008). Im Gegensatz zum Menschen erfolgt keine effektive Transmission der IV in Mäusen (Bouvier, 2010). Zudem sind Mäuse nur wenig suszeptibel für die Infektion mit nichtmausadaptierten humanen IV Stämmen und die Anzahl mausadaptierter Stämme an IV ist limitiert (Bouvier, 2010), so dass auch weitere Tiermodelle wie z. B. Meerschweinchen (Lowen, 2006), Frettchen (Peltola, 2004) und Chinchillas (Tong, H, 2000) von Relevanz zur Untersuchung IV assoziierter Krankheiten sind.

1.2 Mikrobiologie virusassoziierter sekundärer bakterieller Pneumonien

1.2.1 Respiratorische Viren

In der Geschichte sind bezüglich ihrer Letalität und Frequenz die prägnantesten Auftritte sekundärer bakterieller Infektionen mit IAV assoziiert. Wenn auch deutlich seltener, werden auch andere Viren innerhalb viral-bakterieller Koinfektionen detektiert (Techasaensiri, 2010; Peltola, 2011). Auch in Tierversuchsmodellen konnte eine Kopathogenität zwischen *S. pneumoniae* mit sowohl RSV (Stark, 2006), Parainfluenzaviren (Alymova, 2005) als auch humanen Metapneumoviren (Kukavica-Ibrulj, 2009) gezeigt werden, welche vermutlich auf ähnlichen Mechanismen wie die für mit IAV angenommenen basiert. Parainfluenzaviren besitzen Neuraminidasen, welche ähnlich der Neuraminidase von IAV Rezeptoren für Bakterien freisetzen (Alymova, 2005). Sowohl Parainfluenzaviren als auch RSV erhöhen die Bildung des „plättchenaktivierenden Faktor Rezeptors“ (*platelet-activating factor receptor, PAFR*), der von Bakterien zur Anheftung genutzt werden kann (Avadhanula, 2006). Zusätzlich induzieren RSV wie auch IAV die Bildung von Typ I Interferonen, die durch eine Vielzahl potentieller nachgeschalteter Mechanismen die antibakterielle Immunität beeinflussen können (Vissers, 2012).

1.2.2 Influenza A Virus

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Das Genom dieser behüllten Viren besteht aus einer einzelsträngigen, segmentierten RNA negativer Polarität (Hayashida, 1985; Schrauwen, 2014). Sie lassen sich in drei verschiedene Typen (A, B und C) einteilen, wobei IAV und Influenza B Viren regelmäßig zu epidemischen Krankheitsausbrüchen führen (WHO, 2015) und Influenza C Viren lediglich sporadische Erkrankungen (McCullers, 2006) verursachen. Unter allen hospitalisierten Patienten über 16 Jahren stellt das IAV die Hauptursache viral ausgelöster respiratorischer Krankheiten und damit den klinisch

relevantesten Typen von IV dar (Gaunt, 2011; WHO, 2015). Nach Hochrechnungen der Weltgesundheitsorganisation verursachen sie jährlich bis zu 3 – 5 Millionen Fälle schwerer Krankheit, die zu 250.000 – 500.000 Todesfällen allein in den Industriestaaten führen (Stohr, 2003; WHO, 2003). Anhand von Unterschieden der Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) können IAV in weitere Subtypen unterteilt werden. Derzeit existieren achtzehn verschiedene HA- (H1 - H18) und elf NA-Subformen (N1 - N11) (Zhu, 2013, Tong, S, 2013), die entsprechend des Schemas HxNy klassifiziert werden. Die humanpathogenen saisonal zirkulierenden IAV sind auf die Subtypen H1 - H3, N1 und N2 begrenzt, von denen derzeit die Subtypen H3N2 mit etwa 79 % und H1N1 mit 21 % aller getesteten IAV Proben vorherrschen (WHO, 2015). Das aus acht Segmenten (Hayashida, 1985) bestehende Genom der IAV kodiert bis zu sechzehn virale Proteine (Schrauwen, 2014). Die Segmentierung des Genoms ermöglicht den Vorgang des *Reassortments*, der auch als *Antigen-Shift* bezeichnet wird. Bei diesem überwiegend in Wasservögeln auftretenden Phänomen kann es während der Infektion einer Wirtszelle durch verschiedene IAV Subtypen zum Austausch einzelner oder mehrerer Gensegmente zwischen diesen kommen (Dugan, 2008). Betreffen diese Reassortierungen HA- und/oder NA-Segmente ist dies mit der Entstehung neuer Subtypen verbunden. Die nachkommenden Virusgenerationen können neue immunologische Eigenschaften besitzen denen das humane Immunsystem mitunter nichts entgegensetzen kann und zum Ausbruch neuer Pandemien führen. So wurde die IAV Pandemie von 1957 durch die Reassortierung des seiner Zeit grassierenden saisonalen humanen mit einem aviären Virus ausgelöst, wobei die Reassortante die aviäre HA (H2) und NA (N2) trug (Scholtissek, 1978; Webster, 1992). Auch die IAV Pandemie von 1968 wurde durch eine Reassortante, generiert aus einem saisonalen humanpathogenen Virus mit einem aviären HA (H3) Segment, verursacht (Scholtissek, 1978; Webster, 1992). Im Gegensatz dazu wird vermutet, dass die Pandemie von 1918 durch direkte Überbrückung der Speziesbarriere resultierte, indem ein direkt auf den Menschen übertragenes aviäres H1N1 IAV seine Replikation an den humanen Organismus adaptierte (Webster, 1992). Zusätzlich verursacht die virale RNA-abhängige Polymerase, geschuldet durch deren fehlende Korrekturlesefähigkeit (*proofreading*), eine hohe Mutationsrate (Drake, 1993). Dieser als *Antigen-Drift* bezeichneter Prozess verursacht überwiegend einzelne Punktmutationen und erhöht durch geringfügige Unterschiede im viralen Genom der nachkommenden Virusgenerationen die genetische Variabilität der IAV (Guillo, 2005; McCullers, 2006). Generierte Antikörper detektieren zumeist die HA- und NA-Segmente. Durch mögliche Veränderungen dieser können Schutzimpfungen ihre Wirksamkeit verlieren und IV Epidemien auftreten (Wiley, 1981). Beide Mechanismen, *Antigen-Shifts* und

-*Drifts* ermöglichen eine schnelle Veränderung der Viren und stellen somit ein erhöhtes Risiko für sowohl zoonotische Infektionen als auch für die Formation neuer epi-/pandemischer IAV Stämme dar. Auch andere Proteine der IAV, die nicht zur Erhöhung der genetischen Variabilität führen, tragen entscheidend zur Virulenz der Viren bei. Für die Immunevasion inhibiert das „Nicht-Struktur-Protein 1“ (NS1) den intrazellulären Signalweg zur Bildung der antiviral wirkenden Typ I Interferone (Palese, 2007). Das PB1-F2 bindet an die innere Membran der Mitochondrien und ist über die Freisetzung von Cytochrom c an der IAV induzierten Apoptose beteiligt (Conenello, 2007). „*Paired-box-Proteine*“ unterdrücken die zelluläre Expression von Wirtsgenen und verringern in Mäusen über bisher unbekannte Mechanismen die Pathogenität von IAV (Jagger, 2012). Auch wenn Wasservögel das primäre Infektionsziel von IAV sind, befallen sie ebenso andere nichtaquatische Vögel und Säugetiere wie Menschen und Schweine (Webster, 1992; Weinheimer, 2012). Im Gegensatz zu IAV besitzen weder Influenza B Viren noch Influenza C Viren einen tierischen Wirt oder antigenetisch unterschiedliche Subtypen und stellen dadurch kein Risiko für den Ausbruch pandemischer Infektionen dar (McCullers, 2006). Weltweit zirkulieren dennoch seit Langem zwei genetisch verschiedene Linien der Influenza B Viren (Yamagata und Victoria-Linie), die sich entsprechend der IAV in ihren Oberflächenproteinen unterscheiden (RKI 2013).

1.2.3 Bakterielle Erreger

Pneumopathogene Bakterien wie *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (derzeit besonders im Zusammenhang mit den methicillinresistenten Stämmen), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) und *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) sind die am stärksten mit IAV assoziierten sekundären bakteriellen Pneumonien verbundenen Bakterienarten (Morens, 2008). Dennoch unterscheidet sich die Häufigkeit mit der sie jeweils innerhalb vergangener Ausbrüche von IAV Pandemien als sekundäre Pathogene vorkamen. War die IAV Pandemie von 1957 stark durch sekundäre Infektionen mit *S. aureus* (Martin, 1959) gekennzeichnet, fand man während der „Spanischen Grippe“ 1918 (Morens, 2008), der IAV Pandemie von 1968 (Bisno, 1971) sowie in den darauffolgenden Dekaden überwiegend *S. pneumoniae* als dominierenden Erreger. IAV und *S. pneumoniae* stellen die am häufigsten auftretende Erregerkombination viral/bakterieller Koinfektionen der Lunge dar (Grabowska, 2006; McCullers, 2006), resultierend daraus ist über die Grundlagen ihres synergistischen Zusammenspiels weitaus mehr bekannt als über die anderer Erregerkombinationen (McCullers, 2006). *S. pneumoniae* stellt somit ein zentrales Pathogen zur Analyse von IAV assoziierten

Einflüssen auf die angeborene Immunantwort gegenüber sekundären bakteriellen Pneumonien dar.

1.2.4 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae bildet mit durchschnittlich etwa 40 % der isolierten Erreger (Pletz, 2012) die häufigste Ursache der CAP, zusätzlich ist eine Vielzahl von Fällen bakterieller Meningitis, Mittelohrentzündung, aber auch der Sepsis mit dieser Bakterienart assoziiert (Bridy-Pappas, 2005, WHO, 2014). Als transiente Kommensalen besiedeln sie die Schleimhäute des Nasen-Rachenraumes in 20 - 50 % der gesunden Kinder und bei etwa 8 - 30 % der gesunden Erwachsenen (Kadioglu, 2008). Durch Mikroaspiration oder direkte Invasion, oftmals begünstigt durch prädisponierende konditionelle Faktoren des Wirtes wie Herz-Kreislaufkrankungen (Metersky, 2012), gelangen die Erreger in sonst sterile Körperregionen und erzeugen invasive Krankheiten (Bogaert, 2004; Pletz, 2005, Kadioglu, 2008, Lynch, 2009). Weitete sich die überwiegend lobär begrenzte Pneumokokkenpneumonie auf die gesamte Lunge aus, kann dies zur Ausbildung eines akuten Lungenversagens (*acute lung injury*, ALI), aber auch zum akuten Atemnotsyndrom bei Erwachsenen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) führen. Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um ein grampositives Bakterium. Die äußerste Schicht, eine 200 – 400 nm dicke Polysaccharidkapsel, ist kovalent an die Peptidoglykane der Zellwand gebunden (Kadioglu, 2008). Auf bluthaltigen Nährböden erscheinen Kolonien bekapselter Stämme von *S. pneumoniae* schleimig trüb, unbekapselte hingegen transparent. Derzeit sind mehr als 90 Serotypen bekannt, die sich in der strukturellen und chemikalischen Zusammensetzung ihrer Kapsel voneinander unterscheiden, welche einen ihrer dominantesten Virulenzfaktoren darstellt (Lee, 1991, Kadioglu, 2008). Schätzungsweise besitzen Pneumokokken über 100 Oberflächenproteine, von denen viele zu ihrer Pathogenität und Virulenz beitragen (Wizemann, 2001), wie z. B. das „Pneumokokken Oberflächenprotein A“ (PspA), das „Cholinbindeprotein A“ oder das „Pneumokokken Oberflächenadhäsionsprotein A“. Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind das intrazellulär gespeicherte Exotoxin Pneumolysin und Enzyme wie die Neuraminidasen, Hyaluronidase, Autolysin und die „Immunoglobulin A1 Protease“ (Kadioglu, 2008).

Bezüglich des Auftretens der verschiedenen Serotypen in Pneumokokkenpneumonien infolge einer IV Infektion erbrachten Analysen klinischer Daten unterschiedliche Ergebnisse. Während in einer Studie mit Patientenproben von 1977 - 2007 aus dem dänischen nationalen Überwachungssystem überwiegend wenig invasive Serotypen mit einer vorhergehenden IV Infektion identifiziert wurden (Weinberger, 2013), zeigte medizinische Aufzeichnungen von

2007 – 2011 in Korea, dass sowohl die primäre als auch die IAV assoziierte Pneumokokkenpneumonie überwiegend durch die kolonisierenden invasiven Serotypen 3 und 19A verursacht wurden (Song, 2014). Aber auch in der Studie von Song und Kollegen wurden kolonisierende schwach invasive Serotypen (6A; 6B; 11/A/11E) detektiert und zudem zeigte sich besonders bei Patienten mit chronischen Lungenleiden sowie Immundefizienz, dass selten kolonisierende invasive Serotypen (4; 9V/9A) aufgrund ungeklärter höherer Transmission Pneumokokkenpneumonien nach viraler Erkrankung verursachten (Song, 2014). In zwischen 2004 und 2009 untersuchten Patientenproben aus den Vereinigten Staaten zeigte sich eine altersspezifische Prävalenz des Auftretens verschiedener Serotypen infolge einer IV Infektion. So wurde bei Kindern im Alter von weniger als 5 Jahren verstärkt der Serotyp 19A detektiert, während bei den 5 – 24 jähriger der Serotyp 7F vorherrschte und bei den über 24 jährigen nichtbestimmte Serotypen dominierten, welche nicht in der Schutzimpfung (anti 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F und 6A) erfasst waren (Fleming-Dutra, 2013).

1.3 Humaner Respirationstrakt

1.3.1 Aufbau und Funktion

Der humane Respirationstrakt kann in drei funktionale Einheiten unterteilt werden, in die oberen und unteren Atemwegen sowie das respiratorische Lungengewebe (Abb. 2). Nasehöhle, Nasennebenhöhlen und Rachenraum sind Bestandteile der oberen Atemwege. Unterer Kehlkopf, Trachea, Hauptbronchien und in den sie sich verzweigenden Bronchialbaum, bestehend aus intrapulmonalen Lappen-, Segment – und Subsegmentbronchien sowie die Bronchiolen, bilden die unteren Atemwege (Abb. 2) (Bösch, 2014). Im respiratorischen Lungengewebe, bestehend aus den Alveolengängen und den Alveolen selbst, von denen die Lunge ca. 400 Millionen besitzt, erfolgt der Gasaustausch (Bösch, 2014). Die kommensale Besiedlung des oberen Respirationstraktes durch pneumopathogene Bakterien führt in gesunden Individuen nicht zum Ausbruch respiratorischer Infektionskrankheiten. Überwinden sie jedoch diesen Teil des Respirationssystems und dringen in den sterilen unteren Respirationstrakt und das sterile respiratorische Lungengewebe vor, kommt es zur Pathogenese.

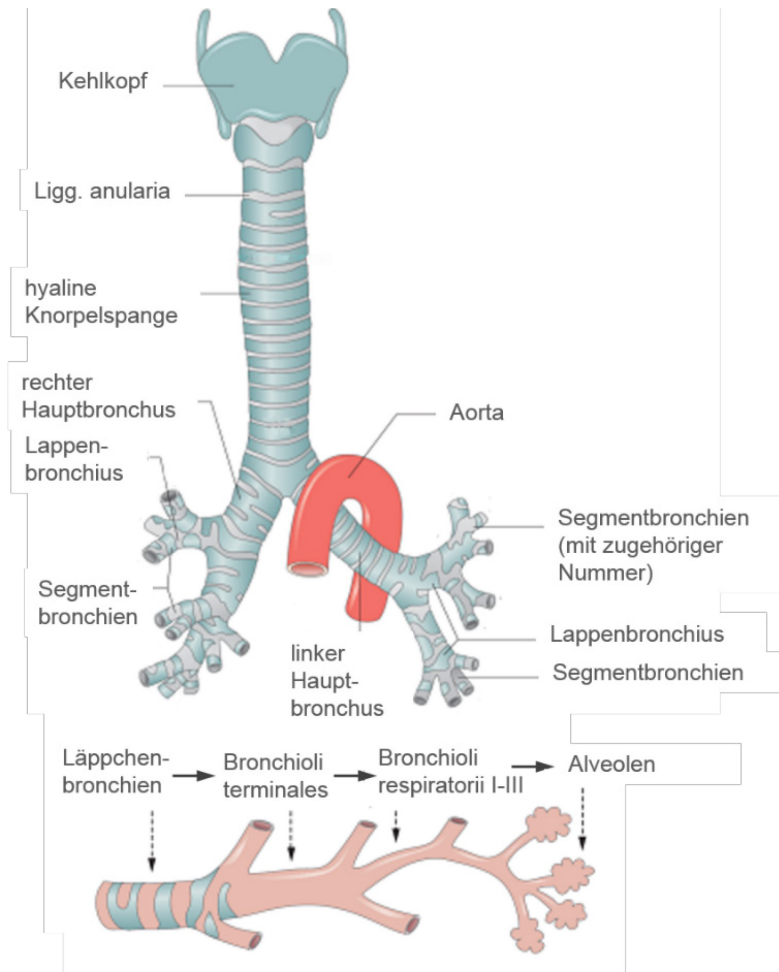


Abbildung 2: Übersicht der unteren Atemwege bis zu den Alveolen.

Schematischer Aufbau der unteren Atemwege des Menschen mit vergrößerter Darstellung der terminalen

Bronchiengenerationen bis zu den Alveoli (aus Bommas-Ebert, 2011).

1.3.2 Die Alveole

Auf die luftleitenden Teile des Respirationstraktes folgen die gasaustauschenden Abschnitte. Aus dem respiratorischen Bronchiolus, welcher auf die finale Teilungsgeneration der Bronchiolen, dem terminalen Bronchiolus folgt, gehen die Alveolargänge hervor. Diese enden in einer traubenförmig angeordneten Gruppe von Alveolen, dem Alveolarsack (Bösch, 2014). Die Alveoli, deren Einzeldurchmesser etwa 0,2 mm betragen, sind durch schmale Alveolarsepten voneinander getrennt (Welsch, 2010). Die Septen sind beidseitig von Alveolarepithel umgeben, welches aus zwei morphologisch und physiologisch voneinander verschiedenen Zelltypen besteht, den Alveolarepithelzellen Typ I (AECI) (Pneumozyten Typ I) und den AECII (Pneumozyten Typ II) (Bösch, 2014) (Abb. 3A und 3B).

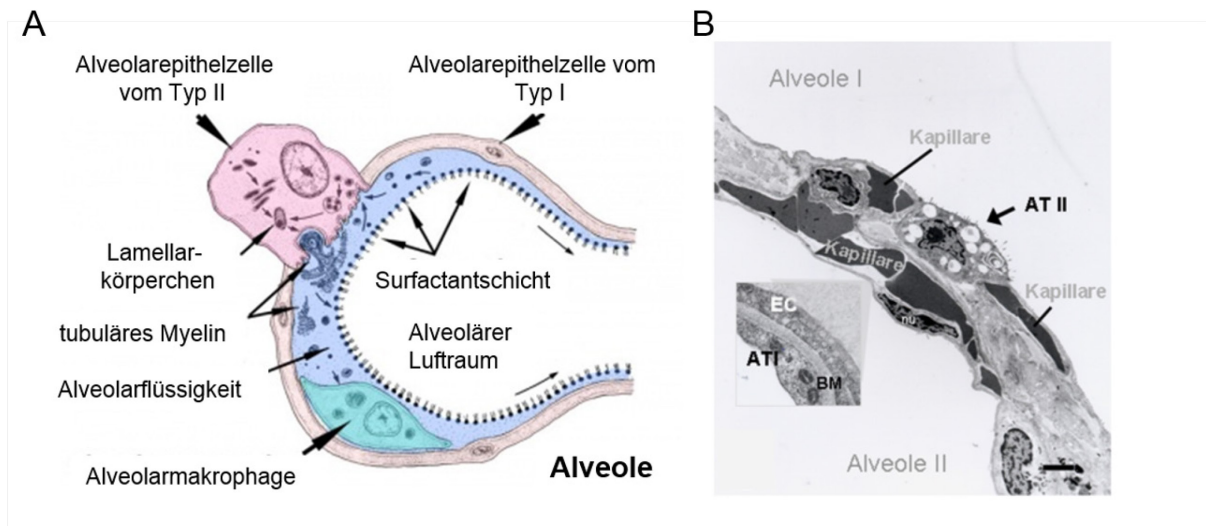


Abbildung 3: Übersicht der terminalen respiratorischen Einheit.

(A) Schematische Darstellung einer Lungenalveole (Hawgood, 1990) (B) und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme peripheren Lungengewebes mit Alveolen und Kapillaren im Querschnitt (ATI bzw. ATII = Alveolarepithelzelle vom Typ I bzw. II, EC = Endothelzelle, BM= Basalmembran) (aus F.H. Netter, 1994)

1.3.2.1 Alveolarepithelzellen vom Typ I

Obwohl AECI beim Menschen nur etwa 8 % der Zellen der Alveolarsepten ausmachen, kleiden sie dessen Oberfläche zu etwa 95 % aus (Crapo, 1982). Morphologisch sind es großflächige, sehr flache Zellen, deren Zellkörper vergleichsweise wenige Organellen besitzt (Ward, 1984). Zusammen mit der Basalmembran und dem Endothel der feinen Kapillaren bilden sie die sehr dünne, für den Gasaustausch zuständige Blut-Luft-Schranke (Ward, 1984; Welsch, 2010). Neben der Gasdiffusion tragen sie durch den parazellulären Transport von Ionen und Wasser über enge Zell-Zell-Verbindungen zur Aufrechterhaltung der Homöostase in der Alveole bei (Williams, 2003). Es handelt sich um terminal differenzierte Zellen, die aufgrund ihrer fehlenden Regenerationsfähigkeit empfindlich gegenüber schädigenden exogenen Einflüssen sind (Ward, 1984).

1.3.2.2 Alveolarepithelzellen vom Typ II

AECII bedecken etwa 5 % der Alveolarsepten und machen etwa 16 % aller Zellen auf der alveolären Oberfläche aus (Crapo, 1982). Sie sind deutlich kleiner als AECI, weisen eine charakteristische kuboidale Morphologie auf und ragen dadurch in den Alveolarraum hinein. Innerhalb ihres organellenreichen Zytoplasmas findet man die sekretorisch aktiven Lamellarkörperchen (Abb. 3A). Diese morphologisch prägnanten Organellen dienen der Bildung und Sekretion des Surfactant „*Surface Active Reagent*“ (Surfactant), welcher einen

oberflächenaktiven Phospholipidfilm bildet (Andreeva, 2007). Zu etwa 90 % wird dieser aus Phospholipiden und zu etwa 10 % aus surfactantassoziierten Proteinen gebildet (Morgenroth, 1986). Der Surfactant verhindert das expiratorische Kollabieren der Alveolen, indem er die Oberflächenspannung in diesen herabsetzt (Fehrenbach, 2001). Neben dem aktiven Ionen- und Wassertransport produzieren sie für das Immunsystem wichtige sekundäre inflammatorische Mediatoren wie z. B. Komplementfaktoren (Strunk, 1988), Zytokine (Finkelstein, 1997). und Chemokine (Rosseau, 2000). Sie sind bedeutsam für die Integrität des Alveolarraums, da sie beschädigte oder zerstörte AECI ersetzen können, indem sie proliferieren und sich zu diesen ausdifferenzieren (Fehrenbach, 1999 und 2001). Neben ihrer physiologischen Relevanz tragen insbesondere die Surfactantproteine A und D zur Abwehr viraler respiratorischer Infektionen bei (Hartshorn, 2010).

1.3.2.3 Alveolarmakrophagen

AM zeichnen sich durch eine kugelförmige Morphologie aus und besitzen in ihrem Zytoplasma eine Vielzahl von Lysosomen, die lichtmikroskopisch als Granula zu erkennen sind. Sie stellen einen essentiellen Bestandteil innerhalb der angeborenen Immunität der pulmonalen Wirtsabwehr dar (Knapp, 2005) und sind regelmäßig in den Alveolen anzufinden. Wie alle Makrophagen gehen sie über einen Zwischenschritt aus Monozyten hervor (Landsman, 2007) und wandern über die Alveolarwand in die Alveolen ein (Linß, 1998). Sie phagozytieren Fremdpartikel, welche mit der Atemluft in die Alveolen gelangen, wie z Bsp. Feinstaub und Mikroorganismen. Durch die Aufnahme eingeatmeter Partikel halten sie die Alveole infektionsfrei ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Im Verlauf von Infektionen sind sie hingegen ausschlaggebend an der Produktion proinflammatorischer (Broug-Holub, 1997; Kooguchi, 1998) und auch antiinflammatorischer Zytokine beteiligt (Knapp, 2003; Beck-Schimmer, 2005). Zudem sind sie in den Surfactantkatabolismus involviert, wo sie nach Aktivierung durch den „*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*“ (GM-CSF) anteilig für das Recycling dieser Proteine zuständig sind (Reed, 2000).

1.4 Mechanismen der viral-bakteriellen Kopathogenität

Durch das Aufeinandertreffen dreier Organismen (Wirt, Virus, Bakterium), resultiert ein breites Spektrum an Interaktionsmöglichkeiten zwischen Wirt und dem jeweiligen Pathogen. Die dadurch ausgelösten pathophysiologischen und immunologischen Reaktionen des Wirtes erzeugen eine Vielzahl potentieller Faktoren, welche der Kopathogenität zugrunde liegen

können (Abb. 4). Je nach Art des Virus beeinflussen spezifische Virulenzfaktoren, im Falle des IAV beispielsweise HA, NA, NS1 oder PB1-F2, den Wirt, wobei unterschiedliche Signalwege der Immunität betroffen sein können. Wenn auch noch weitgehend unbekannt, prägen auch bestimmte stammspezifische bakterielle Virulenzfaktoren wie Kapselproteine, Toxine und bis dato nur hypothetisch geschlussfolgerte Proteine Krankheitsbild (McCullers, 2014).

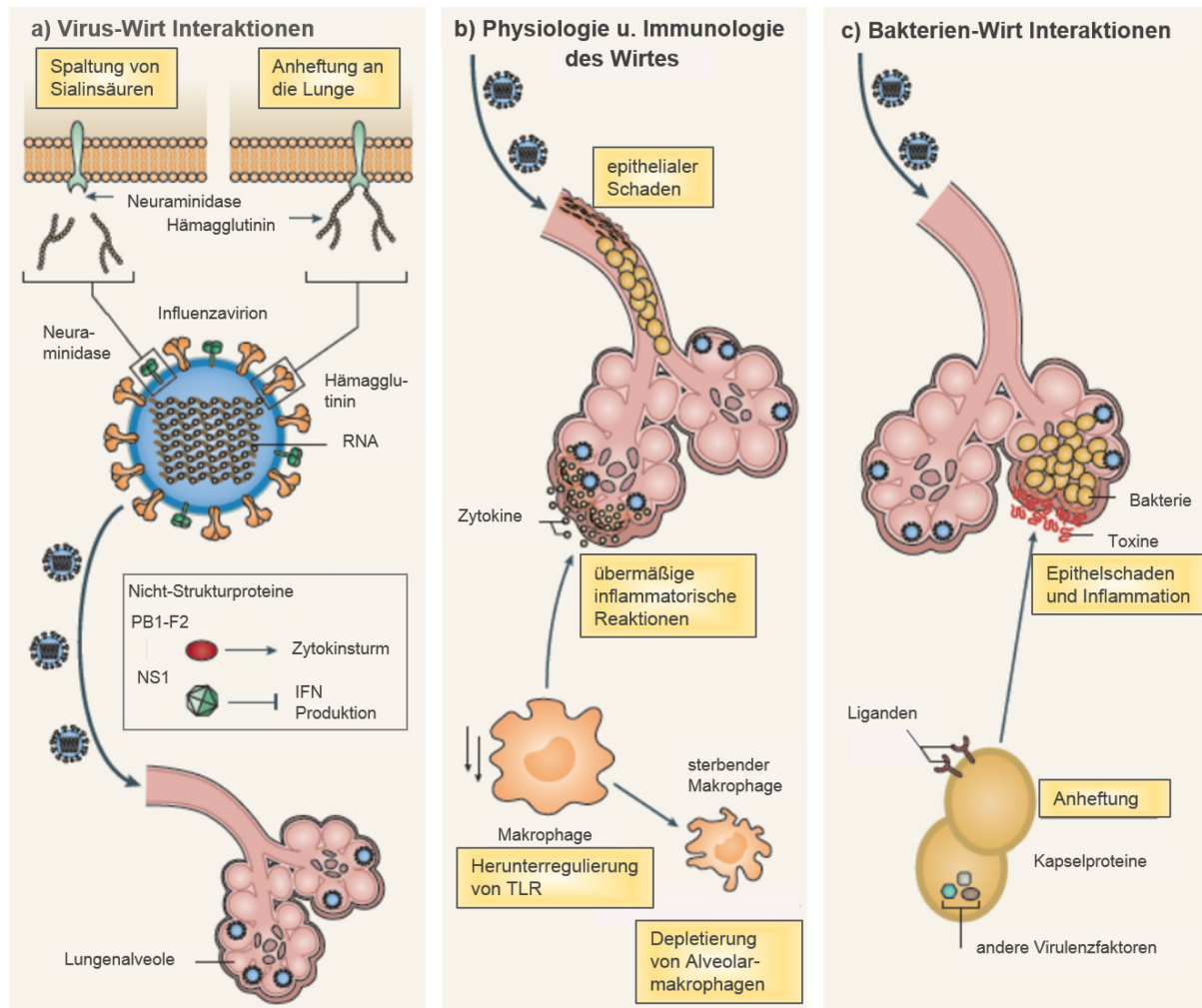


Abbildung 4: Interaktionen zwischen Virus, Wirt und Bakterien während der Koinfektion.

A) Virulenzfaktoren der IV wie HA, NA, NS1 und PB1-F2 interagieren direkt im Wirt mit Zellen in den Alveolen (z. B. AECII) bzw. des Immunsystems (z. B. AM). Obwohl IV über NS1 die IFN Signalwege blockieren können, kommt es dennoch oftmals zur Bildung von IFN. B) Virusinduzierte Effekte führen zur Schädigung des Epithels und zur verstärkten Freisetzung von Zytokinen. Besonders Makrophagen, als zentrale Zellen der angeborenen Immunabwehr, könnten über die Desensibilisierung von TLRs bis hin zur Depletion funktionell beeinträchtigt werden. C) Durch viral induzierte morphologische und inflammatorische Modulationen kommt es zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Pathogenen. So kann beispielsweise *S. pneumoniae* durch PspA oder bakterielle Neuraminidasen an neu freigelegte Rezeptoren wie PAFR oder die infolge der alveolären Reparatur freigelegten Kollagene und Fibrine binden. Zusätzlich führen bakterielle Eigenschaften wie die komplementresistente Kapsel sowie bisher nur hypothetisch geschlussfolgerte bakterielle Proteine dazu, dass die Bakterien vom Immunsystem unentdeckt wachsen können. Bakterielle Zytotoxine wie Pneumolysin verursachen in Zusammenarbeit mit virusinduzierten Immunreaktionen eine starke Inflammation die zur weiteren physischen Schädigungen des respiratorischen Wirtsepithels führt. (verändert nach McCullers, 2014).

1.4.1 Prädisponierende Wirtsfaktoren für die sekundäre Pneumokokkenpneumonie infolge einer Influenza Virus Infektion

Neben den pathogeninduzierten Effekten auf das humane Immunsystem, beeinflussen zusätzlich wirtseigene konditionelle Bedingungen die Schwere IV assoziierter bakterieller Infektionen. Überwiegend davon betroffen sind IV infizierte Kleinkinder und ältere Menschen, was sich in einer altersspezifischen U-förmigen Verteilung von Morbidität und Mortalität hinsichtlich IV assoziierter bakterieller Pneumonien widerspiegelt (Metersky, 2012). Besonders vor dem Erreichen des ersten Lebensjahres zeigen Säuglinge eine hohe Anfälligkeit gegenüber sekundären Infektionen, die im zweiten Lebensjahr abnimmt (Rothberg, 2008). Ab dem Erreichen des 65. Lebensjahres steigt die Gefahr eine IV Komplikation erneut und erhöht sich mit zunehmendem Alter stark. Untypischerweise erkrankten während der H1N1 IAV-Pandemie von 2009 besonders junge Erwachsene an sekundären bakteriellen Infektionen (Chowell, 2009). Aber auch während der IAV-Pandemie von 1918 verstarben, neben Neugeborenen und älteren Menschen, überdurchschnittlich viele Menschen mittleren Alters (Morens, 2007) (Abb. 5).

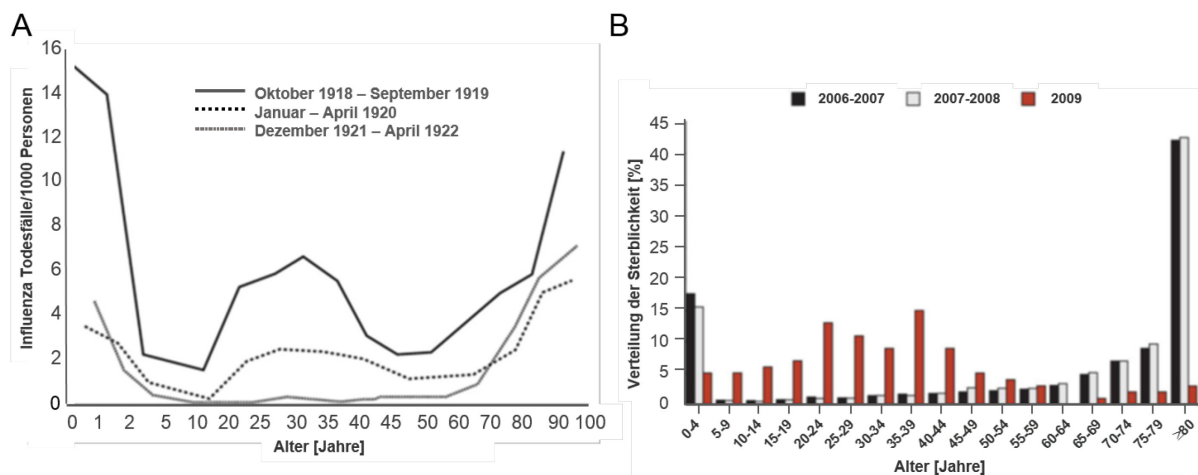


Abbildung 5: Altersspezifische Verteilung schwerer Pneumonien während der IAV Pandemien von 1918/19 und 2009.

A) Eine Statistik aus Breslau von 1918 - 1922 zeigte, dass während der „Spanischen Grippe“ neben der charakteristischen, altersspezifischen Verteilung schwerer IV assoziierter Letalität bei Säuglingen und älteren Menschen, besonders junge Erwachsene von schweren Infektionsverläufen betroffen waren. In den darauffolgenden Jahren näherte sich die Altersverteilung wieder dem gewohnten U-förmigen Verlauf an. (verändert nach Morens, 2007) (B) Dieselbe ungewöhnliche W-förmige Verteilung von influenzaassoziierte Letalität zeigte sich während der IAV (H1N1) Pandemie 2009 in Mexiko, während in den Vorjahren kaum junge Erwachsene, sondern überwiegend Säuglinge und ältere Menschen betroffen waren (verändert nach Chowell, 2009).

Während der IAV-Pandemien von 1957 und 1968 litten viele der Opfer an bereits bestehenden Lungen- und Herzkrankheiten (Trotter, 1959; Bisno, 1971). Präkonditionierende chronische Erkrankungen wie COPD (Mallia, 2007), Asthma (Glezen, 2006) oder Zystische Fibrose (Rajan, 2002) erschweren nachweislich den Verlauf einer IV Infektion und führen oftmals zu schweren Pneumonien. Auch Vorerkrankungen, die nicht primär mit der Lunge assoziiert sind, wie kardiovaskuläre Krankheiten, Diabetes, Nierenleiden, rheumatische Erkrankungen und Demenz stehen in Verdacht ein erhöhtes Risiko der sekundären bakteriellen Pneumonien infolge von IV Infektionen zu verursachen (Metersky, 2012). Derartige Faktoren erhöhen nicht nur in altersbedingten Risikogruppen deutlich die Hospitalisationsraten, auch in der sonst kaum von IV Komplikationen betroffen Altersgruppe der 45 – 64-Jährigen, erhöhen präkonditionelle Beeinträchtigungen Morbidität und Mortalität infolge der IV Infektion (Glezen, 1987, Izurieta, 2000). Zudem haben auch Schwangere und immunsuppressive Patienten ein erhöhtes Risiko sekundäre Infektionen zu erleiden (Neuzil, 1998).

Zusammen mit den gesundheitlichen Faktoren spielen im Verlauf einer IV Infektion auch sozioökonomische Faktoren eine Rolle zur Ausprägung schwerer Pneumonien. Norwegische Studien zeigten, dass Menschen in finanziell ärmeren Gemeinden höhere Mortalitätsraten infolge von IV Infektionen aufwiesen als Menschen in sozial besser gestellten Gemeinden (Mamelund, 2006). Ein weiteres, bisher jedoch kaum untersuchtes Feld stellen genetische Prädispositionen dar, die zur verstärkten Ausprägung von IV Infektion führen können (Albright, 2008). Patienten mit einer saisonalen bzw. pandemischen IAV (H1N1) -Infektion im Jahr 2009 wiesen innerhalb des „interferoninduzierbaren Transmembran 3“ (*interferon-inducible transmembrane 3*, IFITM3) Gens einen Einzelnukleotidpolymorphismus (rs12252-C) auf (Everitt, 2012). Dieser steht ebenfalls in Verdacht mit der erhöhten Zytokinfreisetzung und Todesrate während der IAV(H7N9) -Infektion in Zusammenhang zu stehen (Wang, Z, 2014).

1.4.2 Influenza Virus induzierte Effekte auf den Wirt

1.4.2.1 Morphologische und konformatorische Änderungen

Der chronologisch zuerst identifizierte Mechanismus beschreibt eine verbesserte Anheftung bakterieller Pathogene innerhalb der Atemwegsepithelien der Lunge durch den während der vorhergehende IV Infektion verursachten epithelialen Schaden (Muir, 1919; Wolbach, 1919 beide beschrieben in McCullers, 2006). Diese durch pandemische IAV ausgelöste Schädigung des respiratorischen Epithels wurde mehrfach in Mäusen (Harford, 1949; Loosli, 1975; Plotkowski, 1986 und 1993; McCullers 2001 und 2002) und Menschen (Louria, 1959; Bisno,

1971; Morens, 2008) nachgewiesen. Auch saisonale IAV, welche keinen ernsthaften Lungenschaden induzieren, erhöhen dennoch die Suszeptibilität bakterieller Erreger (Guarner, 2009). Studien in Mäusen zeigten, dass infolge einer gesteigerten Zugänglichkeit bestimmter Rezeptoren, sowohl durch virusinduzierte Schädigung des Epithels als auch durch die erhöhte Rezeptoranzahl infolge inflammatorischer Reaktionen auf die Virusinfektion, die bakterielle Anheftung begünstigt wird (McCullers, 2014). Indem die virale Neuraminidase Sialinsäuren auf der Oberfläche von Wirtszellen spaltet, werden scheinbar verborgene Glykanrezeptoren freigelegt bzw. zerstörte sialysierte Muzine dienen als Rezeptoren für Bakterien (McCullers 2003; Peltola, 2005). Ebenfalls in Mäusen gezeigt, verursachen IAV induzierte inflammatorische Zytokine die verstärkte Bildung von PAFR, welcher wiederum von Pneumokokken zur Anheftung verwendet werden kann (Cundell, 1995). Dementsprechend zeigten PAFR defiziente Mäuse ein geringeres Bakterienwachstum und verbesserte Überlebensraten infolge einer sekundären Pneumokokkeninfektion (van der Sluijs, 2006). Dennoch blieb die Neutralisierung von PAFR mittels Antikörpern in Mäusen ohne Effekt auf die Anheftung der Pneumokokken (McCullers, 2002), so dass die Rolle von PAFR nicht eindeutig geklärt ist.

Während der regenerativen Prozesse infolge einer IAV Infektion (Loosli, 1975) werden Fibrine, Kollagene und andere Matrixelemente deponiert, was in Mäusen potentielle Anheftungsstellen für Bakterien an nichtzilientragenden Zellen schuf, die sich in der Differenzierungsphase befanden (Plotkowski, 1993; De Bentzmann, 1996). Auch die Verengung kleiner Atemwege infolge einer IAV Infektion durch die Zerstörung Alveolar- und Bronchialepithelzellen bzw. die verstärkte Sekretion von Muzinen (Harford, 1950) generierte in Mäusen Voraussetzungen für bakterielle Erreger.

1.4.2.2 Beeinflussung angeborener antibakterieller Immunreaktionen

Die Beeinflussung des Immunsystems durch die vorangehende virale Infektion bietet ein weiteres, breitgefächertes Aktionsfeld potentieller Faktoren, welche dem Zusammenspiel von IAV und Pneumokokken zugrunde liegen können. Klassisch wird zwischen dem schnell, aber auch unspezifisch reagierendem angeborenem Immunsystem und dem später reagierendem, spezifischen adaptiven Immunsystem unterschieden. Innerhalb dieser eher willkürlichen Unterteilung kommt es auf mehreren Ebenen zu Interaktionen beider Anteile (Medzhitov, 2000b; Schjetne, 2003). Innerhalb der angeborenen Immunität gibt es zahlreiche Parallelen in der Abwehr viraler und bakterieller Erreger. Diese umfassen zum einen konstitutive physikalische Barrieren von Schleimhäuten und Körperoberflächen sowie die mechanische

Abwehr von Erregern durch zelltragende Zellen (Medzhitov, 2000a). Zum anderen beinhalten sie die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden innerhalb der inflammatorischen Reaktion auf unterschiedliche Pathogene, überwiegend vermittelt durch die Erkennung konservierter mikrobieller Moleküle, den „pathogenassoziierten molekularen Mustern“ (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) über keimbahnkodierte Rezeptoren, den sog. „Mustererkennungsrezeptoren“ (*pattern recognition receptors*, PRRs). Neben endogenen PAMPs erkennen PRRs auch Moleküle die durch die Schädigung von Zellen freigesetzt werden, sogenannte „schadenassoziierte molekulare Muster“ (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) (Takeuchi, 2010). Durch die darüber vermittelte Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine und die dadurch initiierte Invasion phagozytierender Zellen kommt es im Laufe der Entzündungsreaktion zur Beseitigung des verursachenden Pathogens, bzw. zur Aktivierung einer spezifischen Antwort des adaptiven Immunsystems (Medzhitov, 2000a; Schjetne, 2003; Kumar, 2011). Neben den „Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne (*nucleotid binding- and oligomerisation domain*, NOD) -ähnlichen Rezeptoren“ (*NOD-like-receptors*, NLR), welche sich durch eine zentral gelegene NOD auszeichnen, stellen die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) eine der am besten erforschten Gruppen von PRRs dar. Im Menschen umfasst die TLR Familie zehn und in der Maus zwölf Mitglieder (Kumar, 2011). Dennoch werden über unterschiedliche TLRs mitunter auch die gleichen Signalwege aktiviert. TLR2, welcher bakterielle Lipoteichonsäuren erkennt (Yoshimura, 1999) führt über das Adapterprotein MyD88 vermittelt zur Aktivierung des „nukleären Faktor kappaB“ (NF- κ B) (Koedel, 2004; Beutler, 2004). Aber auch TLR7, welcher der Erkennung viraler ssRNA dient, aktiviert (Lund, 2004) über MyD88 den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Koedel, 2004; Beutler, 2004). Dementsprechend führen sowohl TLR4, welcher bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) erkennt (Chow, 1999), als auch TLR3, der während der IV Replikation anfallende doppelsträngige RNA Intermediate erkennt (Guillot, 2005), unabhängig von MyD88 zur Aktivierung des „Interferonregulierten Faktors 3“ sowie des „Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1“ (Beutler, 2004). Dabei kommt es im TLR4 vermittelten Signalweg über den „Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-rezeptorassoziierten Faktor 6“ auch zur Aktivierung von NF- κ B (Beutler, 2004). Somit führen Pneumokokken- (Bergeron, 1998; Dallaire, 2001) und IAV Infektionen (Julkunen, 2001) im Mausmodell zur Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α , aber auch des antiinflammatorischen IL-10, welches im Falle der IAV Infektion erst im späten Krankheitsverlauf freigesetzt wird (van der Sluijs, 2004). Damit einhergehend wiesen Mäuse mit sekundärer Pneumokokkenpneumonie höhere Level an TNF α , IL-1, IL-6, dem murinen IL-

8 Analogon KC sowie IL-10 auf als Mäuse mit primärer Pneumokokkeninfektion (van der Sluijs, 2004; Smith, 2007). Infolge der dadurch ausgelösten verstärkten Entzündungsreaktion kam es unter anderem zum Einstrom phagozytierender Immunzellen, welche dennoch die Bakterien nicht effektiv beseitigen konnten (van der Sluijs, 2004; Smith, 2007). Verursacht wurde diese Dysfunktion möglicherweise durch die ebenfalls erhöhten Level an IL-10, da IL-10 defiziente Mäuse ein verbessertes Überleben im Verlauf der sekundären Pneumokokkenpneumonie zeigten (van der Sluijs, 2004). Neben dem verstärkten Einstrom inflammatorischer Zellen kommt es durch die erhöhten Level an proinflammatorischen Zytokinen auch zur Schädigung des respiratorischen Epithels und einer damit einhergehenden erhöhten Permeabilität und alveolärem Lungenödem (LeVine, 2001). Eine weitere Hypothese beschreibt, dass es durch eine IAV Infektion zu einer bis zu sechs Wochen anhaltenden Desensibilisierung von TLRs kommt (Diderlaurent, 2008) und somit weniger Zytokine ausgeschüttet werden. In TLR2 defizienten Mäusen konnte jedoch kein Einfluss auf die Schwere der sekundären bakteriellen Pneumonie festgestellt werden (Dessing, 2007), da auch in primären bakteriellen Pneumonien TLR4 einen TLR2 Defekt kompensierte (Dessing, 2008).

1.4.2.3 Interferonvermittelte Auswirkungen auf sekundäre bakterielle Infektionen

Interferone, die zu den wichtigsten Mediatoren der antiviralen Immunität zählen, bilden gleichzeitig einen Faktor der zur Erhöhung der IAV assoziierten bakteriellen Suszeptibilität beiträgt. Die Familie der Interferone lässt sich in drei Klassen einteilen, Typ I, II und III. Zur Klasse der humanen Typ I Interferone zählen IFN α , welches im Menschen dreizehn Subtypen aufweist (Gibbert, 2012) sowie IFN β , während die Klasse der Typ II Interferone ausschließlich durch IFN γ repräsentiert wird.

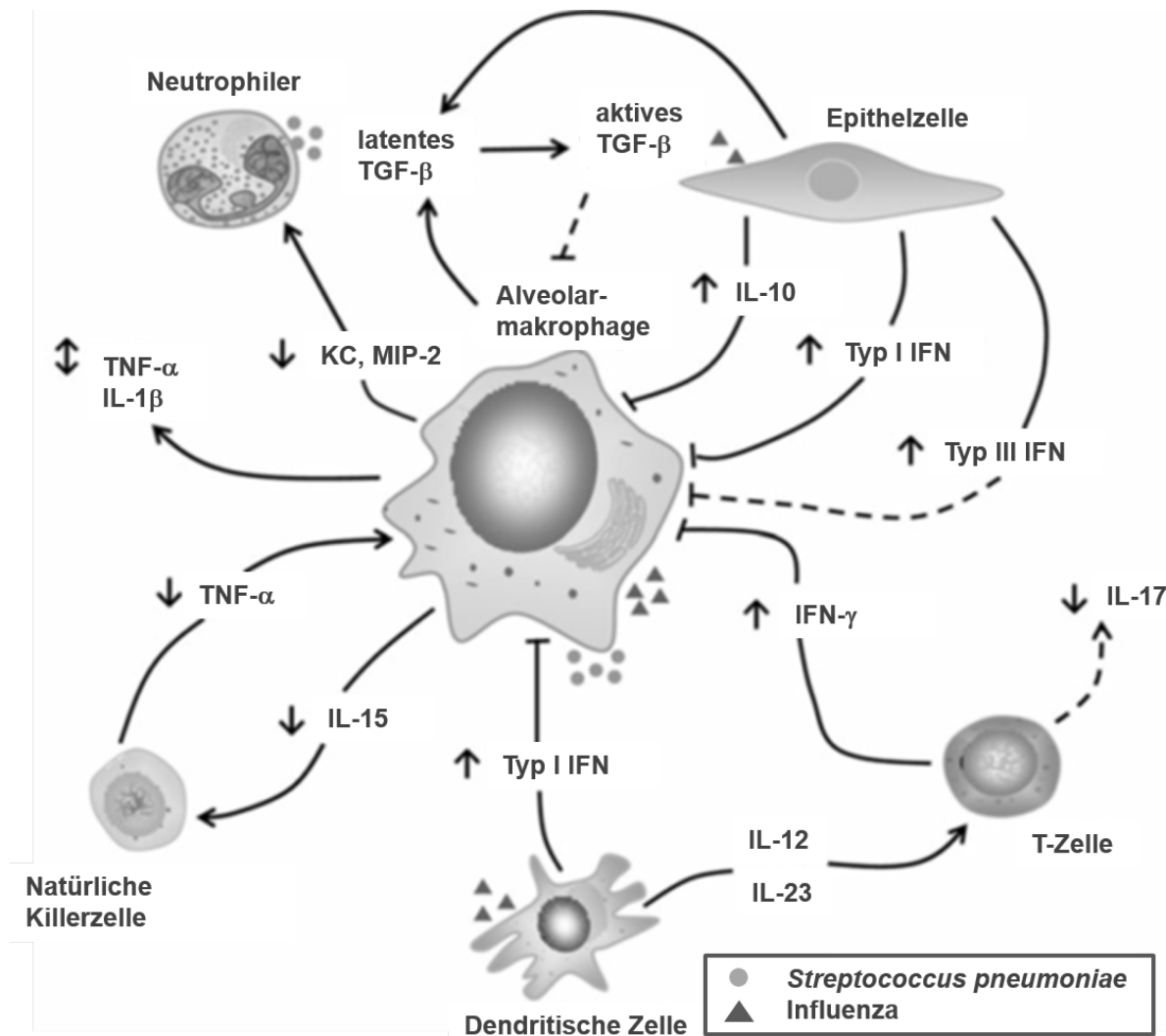


Abbildung 6: IV assoziierte Mechanismen gesteigerter Suszeptibilität gegenüber einer sekundären Infektion mit *S. pneumoniae*.

Die vorangegangene IV Infektion beeinträchtigt das Immunsystems gegenüber sekundären bakteriellen Erregern durch die dysregulierte Sezernierung bestimmter Zyto- und Chemokine, welche sowohl Effekte auf die angeborene als auch die adaptive Immunantwort hat. Unter den postulierten Mechanismen, welche der gesteigerten viral-bakteriellen Kopathogenität zu Grunde liegen könnten, scheinen AM eine zentrale Position einzunehmen. Durch veränderte Profile anti- und proinflammatorischer Mediatoren kommt es über ein komplexes Interaktionsnetz zur Aktivierung (Pfeil) und auch zur Inhibition (Strich) mehrerer Bestandteile und Ebenen der antibakteriellen Wirtsabwehr. Aufgrund der enormen Komplexität potentieller virusinduzierter Modulationen ist ihre Gültigkeit nicht immer eindeutig (gestrichelte Linien), wohingegen andere Mechanismen als validiert gelten (durchgängige Linien). Die Abbildung bezieht sich auf Ergebnisse muriner Studien (verändert nach Ballinger, 2010).

Die historisch erst kürzlich identifizierte Klasse der Typ III Interferone wird von den derzeit drei bekannten Subtypen des IFN λ (IL-27 - IL29) gebildet.

Sowohl für Typ I (Shahangian, 2009; Li, W, 2012) als auch Typ II (Sun, 2008) Interferone wurde ein negativer Effekt auf die Immunantwort bezüglich sekundärer bakterieller Infektionen nachgewiesen. Dabei zeigten Mausversuche mehrere interferoninduzierte Effekte auf die bakterielle Immunität. Neben der von Typ I Interferonen verursachten verringerten Rekrutierung von Neutrophilen, die aus der unterdrückten Bildung der Chemokine CXCL1 und

CXCL2 resultierte (Shahangian, 2009), wurde in Mäusen auch eine reduzierte Anzahl IL-17 produzierender $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt (Li, W, 2012). Die Freisetzung von IFN γ hingegen geht mit der verschlechterten Klärung bakterieller Erreger durch AM einher (Sun, 2008). Weniger untersucht ist die Rolle der Typ III Interferone, die wie Typ I Interferone zur Einschränkung der viralen Replikation sowie der Induktion nachgeschalteter antiviraler Gene beitragen (Ank, 2008) und entscheidend an der mukosalen Immunabwehr beteiligt sind (Sommereyns, 2008). Sowohl IFN λ 1 als auch IFN λ 2 werden im Verlauf einer IV Infektion von humanen AEC freigesetzt (Wang, J, 2009), was zu einer verringerten Freisetzung von Chemokinen führte (Wang, J, 2009). Ob dieser Effekt jedoch einer Verringerung der Viruslast oder einem direkten Effekt auf die Chemokinproduktion geschuldet war, blieb ungeklärt. Mehrfach zeigten *in vitro* Studien an humanen bzw. murinen Monozyten und Makrophagen, dass Typ I (Masters, 2010; Guarda, 2011) und Typ II Interferone (Masters, 2010; Eigenbrod, 2013) mit proinflammatorischen Signalwegen wie dem Inflammasom interferieren und darüber die Bildung von IL-1 β blockieren. Ebenfalls *in vitro*, blockieren Typ I Interferone in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks direkt die Produktion von GM-CSF, einem weiteren zentralen Regulator der pulmonalen Immunabwehr (Aman, 1994; Göllner, 1995).

1.4.2.4 IL-1 β als zentraler Bestandteil der antibakteriellen Immunität

Innerhalb der Immunabwehr mikrobieller Erreger spielt IL-1 als Mediator zahlreicher inflammatorischer Prozesse in nahezu allen Zellen und Organen eine zentrale Rolle (Garlanda, 2013). Zudem ist es grundlegend an pathophysiologischen Vorgängen autoimmuner (z. B. rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose) und degenerativer (z. B. Alzheimer, Parkinson) Krankheiten beteiligt (Dinarello, 2009; Gabay, 2010; Sims, 2010). Von den elf Mitgliedern der IL-1 Familie besitzen sieben immunstimulatorische Aktivitäten (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ), drei sind Rezeptorantagonisten (IL-1RA, IL-36Ra und IL-38) und eines zählt zu den antiinflammatorischen Zytokinen (IL-37) (Dinarello, 2009). IL-1 α , IL-1 β und IL-1RA binden an den gleichen Rezeptor (IL-1R), wobei die Bindung von IL-1RA nicht zur Rekrutierung des IL-1R Akzessorproteins führt, sondern die IL-1 Wirkung inhibiert (Kafka, 2008). Obwohl IL-1 α und IL-1 β von unterschiedlichen Genen kodiert werden, besitzen sie ähnliche biologische Eigenschaften, die jedoch Unterschiede innerhalb immunologischer und inflammatorischer Aktivitäten aufweisen (Garlanda, 2013). Eine aktive Vorstufe von IL-1 α ist konstitutiv in den Epithelien verschiedener Organe, Endothelzellen und Astrozyten zu finden und wird infolge nekrotischen Zelltods sezerniert. Zirkulierendes IL-1 α ist eher an sterilen

Inflammationsprozessen beteiligt und wird im Gegensatz zu IL-1 β selten während schwerer Infektionen detektiert (Chen, 2007; Rider, 2011)

IL-1 β hingegen wird von hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen gebildet (Kafka, 2008, Dinarello, 2011). Funktionell trägt es entscheidend zu inflammatorischen Reaktionen im Zuge der Erregerabwehr bei (Dinarello, 1996), zudem wird es innerhalb chronischer Erkrankungen und akuter Schädigung von Geweben detektiert (Lopez-Castejon, 2011). Besonders in *S. pneumoniae* infizierten Mäusen scheint es bedeutend zur Resistenz gegenüber Pneumokokken beizutragen, während IL-1 α weniger entscheidend scheint (Kafka, 2008). Seine Sezernierung wird über einen zweistufigen Prozess reguliert, durch ein erstes Signal (z. B. die Detektion von PAMPs) kommt es zur Bildung der inaktiven 31 kDa großen Vorstufe pro-IL-1 β , welches größtenteils im Zytosol der Zelle verbleibt (Singer, 1988; Lopez-Castejon, 2011). Erst nach einem zweiten Stimulus (PAMPs, DAMPs, oder auch durch infolge des Zelltodes freigesetzte endogene zelluläre Moleküle) kommt es zur Prozessierung in die aktive Form über eine Konvertase (*IL-1 β converting enzyme*, ICE), die Caspase-1 (Thornberry, 1992). Das proteolytisch gespaltene pro-IL-1 β wird in die aktive etwa 18 kDa große IL-1 β Form gespalten und in den extrazellulären Raum abgegeben. Auch die Caspase-1 liegt zunächst in der inaktiven Vorläuferstufe pro-Caspase-1 in der Zelle vor und wird erst nach Spaltung durch einen Multiproteinkomplex, dem Inflammasom, in seine enzymatisch aktive Form überführt. Allgemein setzt sich dieser Komplex aus einem Adaptermolekül, einem zytosolischen PRR und der pro-Caspase-1 zusammen (Schroder, 2010). Das am besten untersuchte Inflammasom ist das NLRP3 Inflammasom (Schroder, 2010), dessen PRR durch eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einer „leuzinreichen Erkennungsstruktur“ (LRR), einer zentralen Nukleotidbinungsdomäne sowie einer N-terminalen Pyrimidindomäne, charakterisiert ist. Es wird unter anderem über Pneumolysin (PLY), ATP, mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Kumar, 2011) oder den Efflux von Kaliumionen (Muñoz-Planillo, 2013) aktiviert. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist bislang nur teilweise verstanden (Kumar, 2011, Rathinam, 2012). Aber auch andere extrazelluläre Proteasen wie Proteinase-3 (Joosten, 2009) oder Elastase (Black, 1988) sind über inflammasomunabhängige Spaltungen zur Generierung aktiven IL-1 β befähigt (Dinarello, 2011).

1.4.2.5 GM-CSF

Das zu den hämatopoetischen Chemokinen zählende GM-CSF wurde erstmals in den 1970er Jahren aus Mäusen isoliert, welche vorab mit LPS stimuliert wurden (Burgess, 1977). An

seinem Namen ersichtlich wurde es zunächst anhand seiner stimulierenden Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen des Knochenmarks (Sheridan, 1973) charakterisiert. Zudem beeinflusst es auch bereits in der Differenzierung weiterfortgeschrittene myeloische Zellen (Stanley, 1994). Entgegen der Erwartungen zeigten Tierversuche, dass die Hämatopoese trotz des Fehlens von GM-CSF unbeeinflusst blieb und es scheinbar keine entscheidende Rolle in der frühen Myelopoese spielt (Stanley, 1994). Heute gilt es vielmehr als zentraler Bestandteil der Regulation zur Aktivierung von Granulozyten- und Makrophagenlinien aller Differenzierungsstufen (Hamilton, 2004).

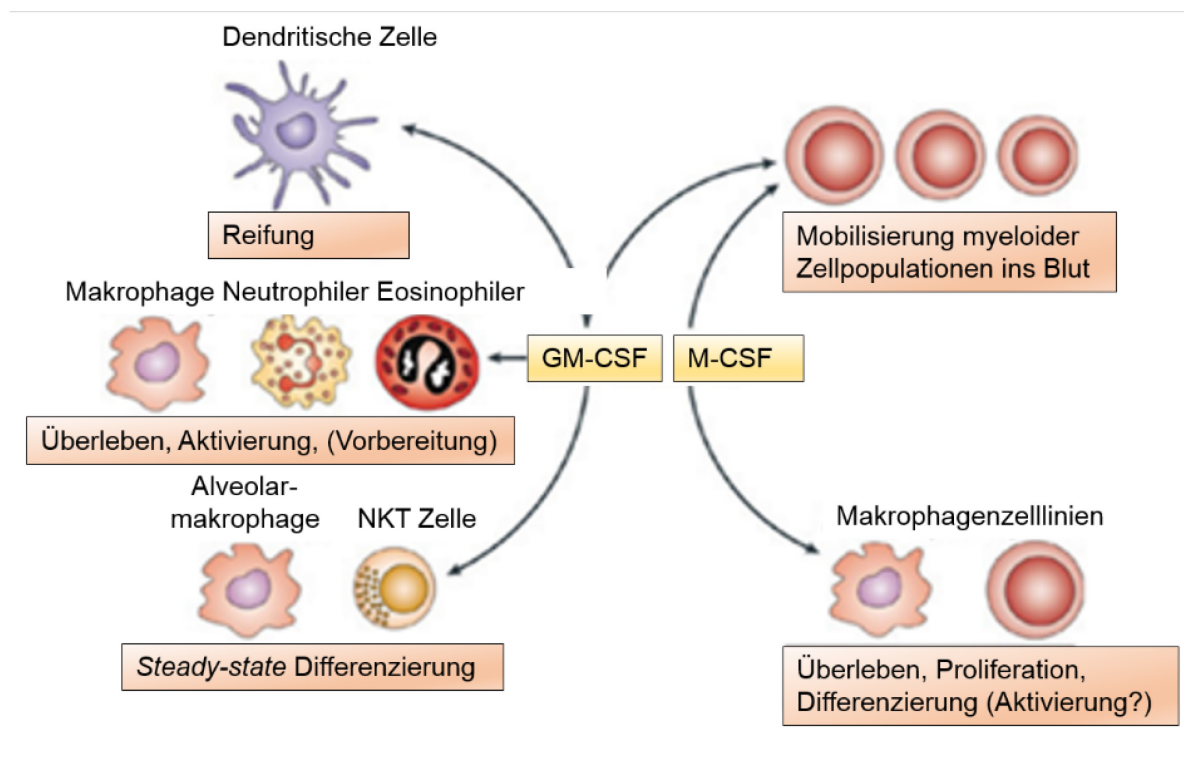


Abbildung 7: Einfluss von GM-CSF auf die Differenzierung myeloider und mononukleärer Zellen.

GM-CSF wirkt fördernd auf das Überleben, die Proliferation und Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und dendritischen Zellen. Zusammen mit weiteren Faktoren wirkt es auf die Mobilisierung myeloider Vorläuferzellen im Blut (verändert nach Hamilton, 2008).

Innerhalb der pulmonalen Immunität trägt es entscheidend zur Ausdifferenzierung von AM (Shibata, 2001) und dendritischen Zellen (Zou, 2002) bei. Durch die Aktivierung dieser Immunzellen ist es wesentlich an der Aktivierung und Orchestration antimikrobieller Reaktionen des angeborenen Immunsystems beteiligt. Zur verbesserten Identifikation bakterieller Erreger verstärkt es auf Makrophagen die Expression von TLR4 (Standiford L., 2012) und CD14 (Shibata, 2001), zusätzlich begünstigt es die Phagozytosekapazität, indem es die Expression von Rezeptoren für aktivierte Komplementfaktoren verstärkt (Armitage, 1998).

Innerhalb der angeborenen Immunabwehr bewirkt es eine Zunahme inflammatorischer Prozesse, durch Verstärkung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ aus Granulozyten und Makrophagen (Fleetwood, 2005).

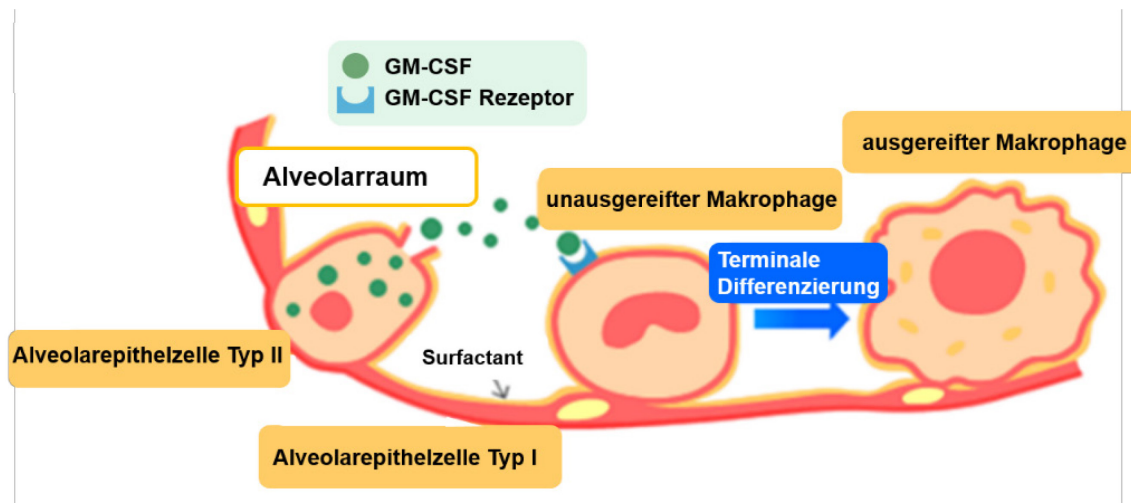


Abbildung 8: Einfluss von GM-CSF auf die Differenzierung von Alveolarmakrophagen.

AECII setzen GM-CSF frei, welches durch die Bindung an den GM-CSF Rezeptor unreifer AM deren terminale Differenzierung in reife AM und deren Aktivierung bewirkt (verändert nach pap-guide, 2015).

Verteilung und Aktivierung dieses Chemokins sind regional komplementiert. Während es im peripheren Blutstrom kaum zu detektieren ist, wurden hohe Konzentrationen in der Lunge nachgewiesen (Gajewska, 2003). Demnach wird GM-CSF lokal gebildet und beschränkt sein Aktionsfeld nur auf direkt umliegende Zellen bzw. Gewebe (Gasson, 1991).

GM-CSF ist ein wichtiger Mediator in der Physiologie der Lunge und beeinflusst sowohl katabolische Prozesse als auch pathophysiologische Vorgänge. Erste klinische Studien zeigten bereits den therapeutischen Nutzen dieses Moleküls im Zusammenhang der Behandlung von ALI (Paine, 2012) und dem pneumonieinduzierten ARDS (Herold, 2014). Neben positiven Effekten auf das Immunsystem, ist seine übermäßige Bildung jedoch mit der Pathogenese inflammatorischer Lungenerkrankungen wie Asthma oder aber COPD verbunden (Hamilton, 2004). Wiederum führt ein Mangel an GM-CSF zur Störung der pulmonalen Homöostase (Dranoff, 1994), was bis hin zur Entstehung der pulmonalen alveolären Proteinose führen kann (Reed, 2000, Uchida, 2004). Unter physiologischen Bedingungen dirigiert GM-CSF partiell die Funktionen von AM (Akagawa, 1988) und stimuliert das Wachstum des AE (Huffman-Reed, 1997). Fehlt GM-CSF, unterbleibt das Recycling des Surfactants durch die AM (Yoshida, 2001), so dass dieses akkumuliert (Dranoff, 1994) und resultiert potentiell in der Entstehung einer pulmonalen alveolären Proteinose. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort besitzt

GM-CSF, besonders über die Aktivierung von AM, wichtige antimikrobielle Eigenschaften. GM-CSF defiziente Mäuse waren anfälliger gegenüber bakteriellen Infektionen, zeigten eine verschlechterte Abwehr der Erreger und wiesen zusätzlich abnormale Zytokinantworten auf (LeVine, 1999). Sowohl in mit Pneumokokken (Steinwede, 2011) als auch mit Staphylokokken infizierten Mäusen (Subramaniam, 2014) verbesserte die intraalveoläre Verabreichung von GM-CSF deren Überlebensrate. Aber auch bei IAV infizierten Mäusen trug GM-CSF über die Erhöhung der Anzahl und Aktivität von AM (Huang H, 2010; Huang F, 2011; Sever-Chroneos, 2011) sowie dendritischen Zellen (Unkel, 2012) zur verbesserten Überlebensrate der Tiere bei.

1.4.3 Bakterielle Effekte auf das Immunsystem des Wirtes

Obgleich der Beitrag bakterieller Faktoren zur erhöhten IAV assoziierten Suszeptibilität sekundärer Pneumokokkenpneumonie kaum untersucht ist, gibt es Hinweise darauf, dass es sich bezüglich des Erregerwachstums um einen bidirektionalen Synergismus handelt. Die Gruppe um McCullers zeigte, dass die sekundäre Pneumokokkeninfektion, über einen bisher unbekannten Mechanismus, zu erhöhten Titern an IAV in Mäusen führte (McCullers, 2002). Auch in Mäusen, die sieben Tage nach der Infektion mit IAV sekundär mit *S. aureus* infiziert wurden, zeigten neben erhöhten Staphylokokken- auch erhöhte Virustiter (Iverson, 2011). Als potentielle Ursache dieser Beobachtung wird die Spaltung viralen HA durch Proteasen der Staphylokokken angenommen, diese Hypothese ist jedoch nicht bewiesen (Tashiro, 1987).

In IAV infizierten Mäusen zeigte die Gruppe um King *et al.*, dass es durch das Oberflächenprotein PspA zur verstärkten Kolonisierung von *S. pneumoniae* kommt. Verglichen mit nichtimmunisierten Kontrolltieren, reduzierte eine Immunisierung mit PspA die in der sekundären Pneumokokkeninfektion auftretende Bakterienlast. Dennoch waren die in der bakteriellen Sekundärinfektion ermittelten Pneumokokkentiter höher als die in der primären Pneumokokkeninfektion PspA immunisierter Mäuse (King, 2009).

Auch *S. pneumoniae* eigene Neuraminidasen dienen der Rezeptorfreilegung und zur Vermeidung der Wirtsabwehr durch die Spaltung von Sialinsäuren auf protektivem Muzinen, dennoch wurde ihnen, vermutlich aufgrund ihrer geringeren enzymatischen Aktivität, keine Einfluss auf die sekundäre bakterielle Pneumonie nachgewiesen (LeVine, 2001; King, 2009). Verglichen mit viralen Virulenzfaktoren ist bisher wenig über den Einfluss von Virulenzfaktoren der Pneumokokken auf die IAV assoziierte Pneumokokkenpneumonie bekannt, so dass weitere Untersuchungen diesbezüglich nötig sind.

1.5 Zielsetzung

Die potentiellen Mechanismen, welche der gesteigerten Pathogenität sekundären bakteriellen Infektionen zugrunde liegen, sind immunologisch hoch komplex jedoch bislang unvollständig verstanden. Überwiegend wurde die Problematik in Mausversuchsmodellen adressiert, so dass die Ergebnisse nicht zwangsläufig die Situation im heterogeneren humanen System widerspiegeln. Zudem stellt der Mensch die am häufigsten von sekundären bakteriellen Pneumonien betroffene Spezies dar, sodass die Etablierung humanrelevanter Untersuchungsmodelle dieses Krankheitsbildes klinisch bedeutsam ist.

- 1) Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst die Etablierung eines humanen *ex vivo* Lungenkulturmodells zur experimentellen Untersuchung IAV induzierter Effekte auf die angeborene Immunantwort einer sekundären Pneumokokkenpneumonie.
- 2) Daran anschließend sollte die Identifikation und Quantifizierung der durch die Infektion mit IAV induzierten Interferone im *ex vivo* infiziertem Lungenkulturmodell erfolgen.
- 3) Aufgrund der beschriebenen Rolle der Typ I und II IFN für die Ausprägung IV assoziierter Pneumokokkenpneumonien, sollte der Einfluss viral induzierter IFN auf die *S. pneumoniae* bedingte Induktion ausgewählter inflammatorischer Parameter (Zyto- und Chemokine) auf Transkriptions- und Translationsebene im *ex vivo* infiziertem Lungenkulturmodell untersucht werden.
- 4) Durch die Isolation und Kultivierung primärer alveolärer Zelltypen (AECII, AECI-ähnlich, AM) aus dem Gewebe und der anschließenden Analyse hinsichtlich ihrer Reaktionen auf die viral-bakteriellen Infektionen, sollten Rückschlüsse potentiell entdeckte Mechanismen auf zellulärer Ebene erzielt werden. Im Verlauf der Zellversuche sollten mechanistische Zusammenhänge besser adressiert und verstanden werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

<i>Gerätename</i>	<i>Hersteller</i>
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Autoklav (Varioklav Typ 75S u 135S)	H+P Labortechnik AG
Bioplex Reader und-Analyzer (Version 4.1)	Bio-Rad
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus®
Dampfgarer MultiGourmet	Braun
ELISA-Reader	Anthos
FastPrep®-24 Gewebehomogenisator	MP Biomedicals
Feinwaage HM-300	A&D Instruments
Fine Iris Scissors	F.S.T.
Konfokalmikroskop	Zeiss
Kreisschüttler 3005	GFL
Labdancer (Mini-Tischvortex)	vWR
LSM 5	Zeiss
LSM 780	Zeiss
Magnetrührer D-6011	Neolab
Mastercycler Personal	Eppendorf
Megafuge mit Ausschwingrotor	Thermo Scientific
Mikrowaage MC5	Satorius
Mini Trans Blot® Cell-Tank-Blot-System inklusive Zubehör	Bio-Rad
Mini-Kreisschüttler MT52	IKA® Werke
Mini-Protean® TetraCell- Elektrophoresekammer mit Zubehör	Bio-Rad
Minizentrifugen	Corning
NanoDrop2000c Spektrophotometer	Thermo Scientific
Odyssey-Scanner	LI-COR Biosciences
Peltier Thermal Cycler (PTC-200)	MJ Research
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Photometer Uvikon X2	BioTek
Polymax 1040 Kreisschüttler	Heidolph
PowerPac™ HC High Current Power Supply	Bio-Rad
Präparationsbesteck (Pinzetten und Student Iris Scissors)	F.S.T.
Schüttelwasserbad SW 23	Julabo
Smart Office Scanner PL2546	PlusTek
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultra-Turrax® Typ T8.01	IKA® Werke
Vakuumsaugpumpe	Millipore

Vortex 2 Genie	Scientific Industries,
Waage 440-33	KERN
Wasserbad WBI-6	Memmert
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biomax Light Röntgenfilme	Sigma Aldrich
Columbia Schafblutplatten	BD
Combitips (1, 2,5, 5 und 10 ml)	Eppendorf
Deckgläschen (20x20 mm)	vWR
Einweg-Biopsiestanzen	pfm
Einweg-Impfösen	Sarstedt
Einweg-Kanülen (0,4 und 0,9 mm)	BD
Einweg-Pipetten, serologisch (2, 5, 10 und 25 ml)	Falcon
Einwegskalpell	FEATHER®
Einweg-Spritzen (1 ml, 5 und 10 ml)	BD
Fastprep Lysing Matrix D Röhrchen	MP Biomedicals
Glasplättchen (12 mm Ø)	Thermo Scientific
Kryoröhrchen (1,5 und 2 ml)	Roth
Küvetten	Sarstedt
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten MaxiSorp, 96- well, runder Boden	Nunc
Mikrotiterplatten, 96 well	Sarstedt
Nitrocellulose-Membran (0,22 und 0,45 µm)	Aersham
Objektträger	SuperFrost
Parafilm	Parafilm
Petrischalen (10 cm)Ø	Falcon
Pipettenspitzen, gestopft, <i>low binding</i> (1000, 200, 10 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Sarstedt
Schraubbecher (100 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier	vWR
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (24, 12 und 6 Vertiefungen)	BD
Zellkulturschalen (10 cm Ø)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zellsiebe (40, 70, 100 µm)	Falcon
Zentrifugenröhrchen (25 und 50 ml)	Falcon

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Calbiochem
Acrylamide/Bis Lösung 19:1, 40 % (v/v)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Avicel RC-581	FMC BioPolymer
Bovines Serum Albumin 30 % Lösung, steril	Gentaur
Bovines Serum Albumin, Fraction V, > 96 %	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
cOmplete, Mini, EDTA-free	Roche
DEAE-Dextran	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Dulbeccos PBS, 10x Pulver konzentriert	Life Technologies
Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) w $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1x)	Life Technologies
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1x)	Life Technologies
Entwickler	Kodak
Ethanol, $\geq 99,8$ %, vergällt	Roth
Ethanol, absolut, unvergällt	Fischer Chemicals
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fixierer	Kodak
Foetal Bovine Serum (FCS) Gold	PAA
Formaldehydlösung (37 %)	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	TAAB
GlycoBlue	Life Technologies
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hank's Balanced Salt Lösung (HBSS) /o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1x)	Life Technologies
Hefeextrakt	BD
HEPES	Roth
Hybridoma-SFM (Serum Free Medium)	Life Technologies
Isopropanol	Roth
Kaleidoscope™ Prestained Standard	Bio-Rad
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kristallviolett	Roth
L-Glutamin (GlutaMax™-I)	GIBCO
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco
Mowiol 4-88	Calbiochem

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumvanadat (NaVO ₃)	Sigma-Aldrich
Odyssey-Blocking-Puffer	LI-COR
Pancoll-Trennlösung, human (Dichte 1,077 g/l)	PanBiotech
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Penicillin/Streptomycin	BIOCHROM AG
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640	Gibco
Roticlear	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth
Todd-Hewitt-Bouillion	BD
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton-X-100	Serva
Tween-20	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,01 M PBS Waschpuffer (für Immunhistologie)	1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl, pH 7,6 alles in Aqua bidest. lösen
10x PBS-T (Waschpuffer für ELISA und Western Blot):	PBS (10x Pulver) in 10 l Aqua bidest + 0,05 % Tween-20 (v/v) lösen für 1x-PBS-T: 1:10 verdünnt mit Aqua bidest.
10x SDS-Elektrophoresepuffer	125 mM Tris-Base final 0,96 M Glycin final 0,5 % SDS final mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, pH 8,3-8,4

	1x SDS-Elektrophoresepuffer: 1:10 verdünnt in Aqua bidest
10x Transferpuffer	<p>Tris-Base 30,3 g</p> <p>Glycin 144 g</p> <p>mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen</p> <p>1x Transferpuffer: 1:10 verdünnt in Aqua bidest. + 20 % Methanol (v/v)</p>
4x SDS Probenpuffer	<p>1,25 ml Tris-Cl (0,5 M, pH 6.8)</p> <p>5 ml SDS (10 % Stock)</p> <p>1,25 ml Bromophenolblau (1 % Stock)</p> <p>2,5 ml Glyzerin</p> <p>Vor Verwendung 1:20 mit β-Mercaptoethanol versetzt!</p>
Formaldehyd-Fixierlösung	4 % Formaldehyd in PBS (v/v)
Kristallviolett-Formaldehydlösung	<p>(a) Kristallviolett-Lösung (20 % (v/v) Ethanol, 1 % (w/v) Kristallviolett in Aqua bidest.)</p> <p>(b) Formaldehyd-Lösung (10 % (v/v) 37 %ige Formaldehyd-Lösung in Aqua bidest.)</p> <p>(c) Kristallviolett-Lösung + Formaldehydlösung (1:10)</p>
Milchpulverlösung	5 % Milchpulver (w/v) in 1x PBS-T
Odyssey-Pufferlösung	Odysseypuffer : PBS (1x) (1:1)
PFA-Fixierlösung	3 % PFA in PBS (w/v)
Phosphoproteinwaschpuffer:	<p>In 1xTBS</p> <p>1 M NaF</p> <p>150 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$</p> <p>200 mM NaVO_3</p>
Phospho-Zelllysepuffer	<p>je 1 ml: 100 μl Tris/HCl (50 mM/ pH 7,4)</p> <p>810 μl Phosphoproteinwaschpuffer,</p> <p>50 μl NP40 (1 % v/v)</p> <p>40 μl Protease-Inhibitor-Cocktail(25x)</p>
Sammelgellösung	<p>Aqua bidest. (3 ml)</p> <p>40%iges Bis-Acrylamid Ratio 19:1 (0,675 ml)</p> <p>Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,25 ml)</p> <p>SDS (10% w/v) (50 μl)</p> <p>APS (10 %ig) (25 μl)</p> <p>TEMED (10 μl)</p>
Trenngellösung 10 % / 13 %	<p>Aqua bidest (4 ml / 3,05 ml)</p> <p>40%iges Bis-Acrylamid Ratio 19:1 (3,35 ml / 4,35 ml)</p> <p>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (2,5 ml / 2,5 ml)</p> <p>SDS (10 % w/v) (100 μl / 100 μl)</p>

	APS (10 %ig) (50 µl / 50µl) TEMED (10 µl / 10 µl)
Tris-EDTA-Puffer	10 mM Tris Base 1 mM EDTA Lösung, pH 9,0
Verdünnungsmedium Immunfluoreszenzfärbungen	10 mM PBS 1 % BSA (w/v) 0,05 % Tween-20 (v/v)

2.1.5 Medien und Zusätze

Tabelle 5: Medien und Zusätze für MDCK-Zellen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Kultivierungsmedium	
MEM	500 ml
FCS	10 % (v/v)
Glutamin	1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
Avicel Überschichtungsmedium (10 ml)	
Avicel Stocklösung	2,5 % (w/v) in Aquabidest.,autoklaviert 4,86 ml
2x konzentriertes MEM Medium	autoklaviert 4,86 ml
BSA 30 % (w/v) Lösung, sterile	66,7 µl
NaHCO ₃ Stocklösung	5 % (w/v) in Aqua bidest., sterilfiltriert 100 µl
DEAE-Dextran Lösung	1 % (w/v) in Aqua bidest., sterilfiltriert 100 µl
TPCK Trypsin Stock (1 mg/ml)	10 µl
PBS++/BSA für Virusinkubation	
PBS Dulbecco w Ca ²⁺ , w Mg ²⁺	500 ml
BSA 30 % (w/v) Lösung, sterile	1 % (v/v)
Einfriermedium	
Kulturmedium	x ml
DMSO	10 % (v/v)

Tabelle 6: Medien und Zusätze für Lungenkulturen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Kultivierungsmedium = Infektionsmedium	
RPMI-1640	500 ml
BSA 30 % (w/v) Lösung, steril	1 % (v/v)
Glutamin	1 % (v/v)

Tabelle 7: Medien und Zusätze für primäre AEC (AECII, AEC I-ähnlich)

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium	
RPMI-1640	500 ml
FCS	10 % (v/v)
Glutamin	1 % (v/v)
Infektionsmedium	
RPMI-1640	500 ml
FCS	2 % (v/v)
Glutamin	1 % (v/v)

Tabelle 8: Medien und Zusätze für isolierte AM

Bezeichnung	Zusammensetzung
Initiales Kultivierungsmedium (bis 4 h nach Isolation)	
RPMI-1640	500 ml
Kultivierungsmedium = Infektionsmedium	
RPMI-1640	500 ml
FCS	2 % (v/v)
Glutamin	1 % (v/v)

Tabelle 9: Medien und Zusätze für *S. pneumoniae*

Bezeichnung	Zusammensetzung
Boullion zum Anziehen	
Tod-Hewitt-Yeast-Medium (THY)	1 l (fertiges Medium bei 115 °C, 10 min autoklavieren)
Tod-Hewitt-Bouillon	30 g
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Einfriermedium	
THY	autoklaviert!
Glyzerin	20 %, steril

2.1.6 Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper und Seren

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Anti-Aktin [Maus]	A1978	Sigma-Aldrich
Anti-Aktin [Ziege]	sc-1616	Santa Cruz
Anti-Caveolin-1 (N-20) [Kaninchen]	sc-894	Santa Cruz
Anti-COX-2 [Ziege]	sc-1747	Santan Cruz
Anti-human CD68 [Maus]	Ab955-500	Abcam
Anti-Influenza A [Ziege]	OBT1551	Serotec

Anti-pan-Cytokeratin [Maus]	sc-8018	Santa Cruz
Anti-pro-IL-1 β (C-20) [Kaninchen]	sc-1250	Santa Cruz
Anti-Prosurfactant Protein C (pro-SP-C) [Kaninchen]	AB3786	Millipore
Anti- <i>S. pneumoniae</i> Serotyp 2	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Hammerschmidt (Universität Greifswald)	
Ziegenserum	G9023	Sigma-Aldrich

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

<i>Sekundärantikörper [Spezies]</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Hersteller</i>
Affe-Anti-Ziege IRDye®700 DX konjugiert	605-730-002	Rockland
Affe-Anti-Ziege IRDye®800 DX konjugiert	605-732-125	Rockland
Ziege-Anti-Maus-Alexa Fluor-488	A11017	Invitrogen
Kaninchen-Anti-Ziege-Alexa Fluor 488	A11070	Invitrogen
Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor 594	A11005	Invitrogen
Ziege-Anti-Maus IgG-HRP	sc-2005	Santa Cruz
Ziege-Anti-Kaninchen IgG-HRP	sc-2004	Santa Cruz

2.1.7 Enzyme

Tabelle 12: Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Hersteller</i>
DNaseI (Bovine Pancreas)	260913	Calbiochem
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	4368814	Applied Biosystems
TPCK Trypsin	T1426	Sigma Aldrich
Trypsin	T-8003	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA (1x)	L11-004	PAA
DNaseI (Bovine Pancreas)	260913	Calbiochem

2.1.8 Reaktionssysteme und Kits

Tabelle 13: Reaktionssysteme und kommerzielle Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Hersteller</i>
Bio-Plex Pro Human Cytokine, Chemkine, Growth Factor Assay, Bio-Rad	über persönliches Angebot erstellt	Bio-Rad
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	11644793001	Roche
Direct-Zol™ RNA-Mini-Prep Kit	2052	Zymo Research
DyLight 488 Microscale Antibody Labeling Kit	53025	Thermo Scientific
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368813	Applied Biosystems
Human GM-CSF ELISA Ready-SET-Go! (first and 2nd Generation)	88-8337	ebioscience

Human IFN α Platinum ELISA	BMS216CE	ebioscience
Verikine-HS™ Human IFN β Serum ELISA kit	41415	pbl assay science
Human IFN γ ELISA Ready-SET-Go!®	88-7316	ebioscience
Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go! (first and 2nd Generation)	88-7261	ebioscience
Human IL-29 (IFN λ_1) ELISA Ready-SET-Go!®	88-7296	ebioscience
Human IL-6 ELISA Set BD OptEIA™	555220	BD Bioscience
Human IL-8 ELISA Set BD OptEIA™	555244	BD Bioscience
Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!®	88-7346	ebioscience
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	32106	Thermo Scientific

2.1.9 Taqman Sonden

Tabelle 14: TaqMan Sonden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Amplikonlänge [bp]</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Chromosomen-Lokalisation (NCBI)</i>	<i>Hersteller</i>
CSF2	85	Hs00929873_m1	Chr.5: 131409485 – 131411859	Life Technologies
GAPDH	93	Hs02758991_g1	Chr.12: 6643657 – 6647536	Life Technologies
IL-1 β	91	Hs01555410_m1	Chr.2: 113587337 - 113594356	Life Technologies
IL-18	115	Hs01038788_m1	Chr.11: 112013976 – 112034840	Life Technologies
PTGS2	75	Hs00153133_m1	Chr.1: 186640944 – 186649559	Life Technologies
TNF α	143	Hs01113624_g1	Chr.6: 31543350 – 31546112	Life Technologies

2.1.10 Stimulanzen

Tabelle 15: Stimulanzen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produktnummer</i>	<i>Hersteller</i>
IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra	Anakinra	Zur Verfügung gestellt von der Charité Berlin Station 48/49	
Interferon β (Typ I Interferon)	IFN β	300-02BC	PeproTech
Interferon γ (Typ II Interferon)	IFN γ	300-02	PeproTech
Interleukin 1 β	IL-1 β	201-LB/CF	R&D
Tumornekrosefaktor- α	TNF α	210-TA-050	R&D

2.1.11 Untersuchungsobjekte

Tabelle 16: Verwendete Untersuchungsobjekte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Kapitel Methodik</i>
Gewebe			
Lungenkulturen		Mensch	2.2.1.5
Zellen			
Madin-Darby Canine Kidney-Zellen	MDCK-Zellen	Hund	2.2.1.4
primäre Alveolarmakrophagen	AM	Mensch	2.2.1.6.1
primäre Alveolarepithelzellen vom Typ II	AECII	Mensch	2.2.1.6.2
primäre Alveolarepithel Typ I-ähnliche Zellen	AECI-ähnlich	Mensch	2.2.1.6.3

2.1.12 Pathogene

2.1.12.1 Influenza A Virus

Tabelle 17: Influenza A Virus

<i>Bezeichnung</i>	<i>Subtyp</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Abkürzung</i>
A/Panama/2007/1999	H3N2	saisonales Influenzavirus	Pan/99

Der Virusstamm wurde freundlicherweise von Dr. Thorsten Wolff (RKI Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung erfolgte auf MDCK Zellen (2.2.2.1).

2.1.12.2 Pneumokokken

Tabelle 18: *Streptococcus pneumoniae*

<i>Spezies</i>	<i>Serotyp (ST)</i>	<i>Stamm</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Abkürzung</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	D39 NCTC7466	Laborstamm	<i>S. pneumoniae</i> D39 (<i>S. p.</i> D39)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	SN35209	Klinisches Isolat	<i>S. pneumoniae</i> ST3

Der *S. pneumoniae* D39 (NCTC7466) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt (Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald), der Serotyp 3 (ST3) (SN35209) von Dr. Mark van der Linden (Nationales Referenzzentrum für Streptokokken, Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht beider Serotypen erfolgte wie in 2.2.2.3 und 2.2.2.4 beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Lungen- und Zellkulturen wurden steril (Sterilwerkbank, Laminar-Flow) durchgeführt. Medien und Zusätze wurden vor der Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Soweit nicht anders vermerkt fanden alle Inkubationen der Zell- und Lungengewebekulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

2.2.1.1 Anlegen von Kryostocks

Der Zellkulturüberstand einer T75–Zellkulturflasche wurde entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 2 min bei 37 °C mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA in PBS) inkubiert. Durch Spülen mit einer serologischen Pipette lösten sich die Zellen vom Flaschenboden, anschließend wurden 8 ml des Kulturmediums zugegeben und die Zellen vollständig resuspendiert. Die zentrifugierten Zellen (1000 rpm, 5 min) wurden in 3 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen zu je 1 ml Zellsuspension verteilt und in einer mit Isopropanol gefüllten Box für mindestens 24 h bei -80 °C gelagert bevor sie final in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Kryoröhrchen mit in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 12 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in T75–Zellkulturflaschen ausgesät. Der Wechsel des Mediums erfolgte am nächsten Tag.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Ein Volumen von 10 µl in Kulturmedium gelösten Zellen wurde auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und alle vier Quadranten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl berechnete sich anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl aus 4 Quadranten} / 2 \times 10^4 \text{ (Kammerkonstante)}$$

Die gelösten Zellen wurden entsprechend in Kulturmedium verdünnt und ausgesät.

2.2.1.4 Zellkultur von MDCK-Zellen

Bei MDCK-Zellen handelt es sich um eine Epithelzelllinie aus der Niere eines gesunden Hundes (Madin, 1958), welche standardmäßig für den IV Plaque Assay (siehe Kapitel 2.2.2.2.)

verwendet wird. Die Zellen wurden in T75–Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium kultiviert. Die Umsetzung erfolgte bei etwa 95 % Konfluenz indem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml Trypsin bei 37 °C abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen wurden. Ein Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 rpm) trennte die sedimentierten Zellen vom Enzym. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium gelöst und entsprechend umgesetzt. Der Austausch des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage.

2.2.1.5 Präparation und Kultivierung humanen Lungengewebes

Die humanen Lungengewebeproben stammten aus der freundlichen Kooperation mit vier lokalen thoraxchirurgischen Kliniken (Emile von Behring Klinikum Berlin Zehlendorf, DRK Klinikum Berlin Mitte, Vivantes Klinikum Berlin Neukölln und Charité Berlin Mitte). Die Mehrheit der Patienten musste sich aufgrund eines Bronchialkarzinoms einer Lungenteilresektion unterziehen, die 67 verwendeten peripheren Lungengewebeproben waren tumorfrei. Das überwiegend alveoläre Lungengewebe stammte sowohl aus den oberen als auch den unteren Lungenlappen. Etwa 95 % der teilnehmenden Patienten waren Raucher, das Durchschnittsalter der aller Studienteilnehmer lag bei 60 ±12 Jahren, eine geschlechtsspezifischen Verteilung wurde nicht beachtet. Alle Patienten wurden vor dem chirurgischen Eingriff aufgeklärt und erklärten sich schriftlich zur Verwendung des entnommenen Lungengewebes für die Studie bereit. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité (Projekte WEA2/050/08 und EA2/023/07) genehmigt.

Um Sterilität zu gewährleisten wurde das Gewebe unmittelbar nach Entnahme des Organteilpräparates im OP oder in der Schnellschnittdiagnostik abgetrennt, in gekühltes steriles RPMI-Medium überführt und unverzüglich mittels eines Kurierdienstes in das Infektionslabor gebracht. Der Transport erfolgte in Styroporboxen, welche durch Kühllakkus auf 4 °C temperiert wurden. Zwischen der Entnahme des Präparates im OP und der Prozessierung im Labor lagen maximal 4 h. Unmittelbar nach dem Transport erfolgte die Präparation des Lungengewebes. Um die mechanische Belastung minimal zu halten, wurde es mit Präparationspinzetten vorsichtig an den äußersten Ecken fixiert. Zunächst wurden Pleurafragmente mit einem Skalpell entfernt und das Lungengewebe in ca. 3 mm dicke Streifen geschnitten. Aus diesen wurden mit Hilfe einer Biopsiastanze (8 mm) die finalen Präparate generiert (8 x 8 x 3 mm, 150 mg). Nach Entfernung des durch die Präparation ausgetretenen Blutes von den Gewebestücken durch Waschen in frischem RPMI-Medium, wurden die Lungenpräparate gewogen und in Kulturgewebescheiden überführt. Die sich anschließende Vorinkubation des Gewebes bei 37 °C über Nacht (ÜN) erfolgte in 24-, 12- oder 6-well Platten

mit 1,5, 2 bzw. 4 ml in Kulturmedium diente zum einen der Befreiung des Gewebes von perioperativ appliziertem Antibiotika, zum anderen konnte sich die durch chirurgische und präparative Manipulation bedingte Aktivierung des Gewebes beruhigen und sich den veränderten Kulturbedingungen anpassen.

2.2.1.6 Isolation primärer Zellen aus humanem Lungengewebe

Die Isolation erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll der Gruppe um Elbert *et al.* (Elbert, 1999). Inkubation und Kultivierung aller Zellen erfolgte wenn nicht anders vermerkt bei 5 %CO₂ und 37 °C. Die Reinheit der isolierten primären Zellen wurde durch Immunfluoreszenz unter Verwendung von Antikörpern gegen pro-SP-C (AECII), CD68 (AM), Caveolin-1 (AECI) und VE-Catherin (Endothelzellen) überprüft (siehe 2.2.4.3).

2.2.1.6.1 Alveolar Makrophagen (AM)

Humane AM sind ausdifferenzierte phagozytierende Zellen monozytären Ursprungs, welche in die Alveole einwandern.

Für die Isolation wurde das Lungenstück zunächst in HBSS gespült und anschließend in etwa 2 x 4 x 2 cm große Stücke geteilt. Die wiederholte Injektion von HBSS in verschiedene Stellen der Gewebestücke und das vorsichtige Herauspressen der Flüssigkeit aus diesem generierte ein AM haltiges Zellgemisch. Es wurde so oft HBSS injiziert bis die austretende Flüssigkeit farblos klar war, das Gewebe makroskopisch grau und blutleer erschien. Das Gemisch wurde zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 12 °C), das Zellpellet in RPMI resuspendiert und die ausgezählten Zellen in 6-well-Platte eingesät (1,3x10⁶ Zellen in 2 ml je well). Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit HBSS gewaschen um Erythrozyten und Zelldebris zu entfernen, die weitere Kultivierung erfolgte in RPMI (+2 % FCS und 2 mM Glutamin). Das Medium wurde alle 24 h gewechselt.

2.2.1.6.2 Alveolarepithelzellen Typ II

Nach der Isolation der AM wurde das Lungengewebe in kleinere (ca. 1 x 1 x 1 cm) Stücke zerteilt und in jedes Stück Trypsin (0,25 % in HBSS) injiziert. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Gewebe mit Hilfe spezieller Präparationsscheren zerkleinert (< 1 mm³) und die Gewebesuspension mit frischem Trypsin versehen. Um eine durchgängige Umspülung der Gewebesuspension mit dem Enzym zu gewährleisten erfolgte der Verdau im Schüttelwasserbad (37 °C, 70 rpm). Nach 25 min wurde DNase I (350 U/ml) zugegeben und das Gemisch für weitere 20 min inkubiert. Durch die Zugabe von 40 % (v/v) FKS sind die Enzymreaktionen gestoppt worden. Zur Stabilisierung der Zellen wurde die Suspension aus

Lungenstücken und freien Zellen 5 min lang invertiert. Nach wiederholtem Auf- und Abpipettieren mit entsprechenden 25, 10, 5 und 2 ml Pipetten wurde die Zell-/Gewebesuspension durch ein Metallsieb (Porengröße ca. 0,5 mm) sowie durch Zellsiebe absteigender Porengröße (100, 70 und 30 μm) aufgetrennt. Das Filtrat wurde zentrifugiert (1300 rpm, 12 min, RT), die sedimentierten Zellen in einem Gemisch aus HBSS:Hybridoma-SFM (1:1) resuspendiert und in T75-Zellkulturflaschen für 1,5 h inkubiert um Makrophagen durch differentielle Adhärenz zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension abgenommen, die Zellkulturflaschen mit 5 ml HBSS gespült und beides zusammen erneut zentrifugiert (12 min, 1300 rpm, RT). Nachdem das Zellpellet in Kulturmedium gelöst und die Zellsuspension 45 min in Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) inkubiert wurde um Fibroblasten zu entfernen, wurden erneut die nicht adhärenen Zellen abgenommen, zentrifugiert (12 min, 13000 rpm, RT) und das Zellpellet in 5 ml HBSS gelöst. Die Zellsuspension wurde auf einen Pancoll-Gradienten (obere Phase 1,077 g/l, untere 1,04 g/l) geschichtet. Nach der Zentrifugation (1100 rpm, 20 min, RT ohne Bremse) befanden sich die AECII in der Interphase, welche gezielt abgenommen, mit HBSS auf 40 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 12 min, RT) wurde. Das Pellet wurde erneut in 20 ml HBSS resuspendiert und der Waschschrift zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und entsprechend in 24-well-Kulturplatten ausgesät (10^6 Zellen/well). Nach 24 h wurde die Hälfte Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt. Nach 48 h erfolgte der erste komplette Wechsel des Mediums, dann alle 24 h. Die Versuche erfolgten 3-4 Tage nach der Isolation. Primäre humane AECII wurden für jeden Versuch frisch aus dem Lungengewebe isoliert und ausschließlich ohne Passagieren verwendet.

2.2.1.6.3 Alveolarepithelzellen Typ I-ähnlich

Die Isolation primärer AECI gestaltet sich aufgrund ihrer starken interzellulären Verbindung sowie den dünnen zytoplasmatischen Ausläufern sehr schwierig. Bisher gelang ihre erfolgreiche Isolation nur aus Rattenlungen (Dobbs, 1998). Zudem sind sie, vermutlich ebenfalls aufgrund der langen Ausläufer, nicht zur Proliferation befähigt (Weibel, 1974), was eine Kultivierung primär isolierter AECI erschwert. Überwiegend wurden aus Ratten stammende, aber auch humane primär isolierte AECII, *in vitro* auf Gewebekulturschalen oder Filtermembranen innerhalb von 8 - 10 Tagen zu AECI-ähnlich transdifferenziert (Fuchs, 2002; Bhaskaran, 2006). Gekennzeichnet ist die Transdifferenzierung durch den Verlust der typischen Morphologie der AECII, diese flachen stark ab und sind nicht mehr zur Synthese des für AECII

charakteristischen Surfactants befähigt (Dobbs, 1985; Fuchs, 2003). *In vivo* zeigten AECII geschädigten Lungengewebes ähnliche Veränderungen (Fehrenbach, 1999), so dass entsprechend der *in vivo* Transformation von AECII zu AECI der beobachtete Prozess *in vitro* als Transdifferenzierung zu AECI-ähnlich bezeichnet wird (Borok, 1998; Fuchs, 2002; Bhaskaran, 2006). Erste metabolische und morphologische Transdifferenzierungsprozesse setzen bereits nach 24 stündiger Kultivierung der AECII ein und dauern etwa 10 Tage an.

Die in der Studie verwendeten AECI-ähnlich transdifferenzierten sich während einer 11-tägigen Kultivierung isolierter AECII (Kapitel 2.2.1.6.2) aus diesen. Der Mediumswechsel erfolgte bis zum vierten Tag nach der Isolation entsprechend den AECII, dann alle 48 h. Es erfolgte keine Passagierung.

2.2.2 Infektiologische Arbeiten mit Zell- und Lungenkulturen

2.2.2.1 Virusanzucht auf MDCK-Zellen

Für die Herstellung von Virusstocks wurden MDCK-Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Infektion erfolgte bei einer Zellkonfluenz von 90 %. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,001 bei RT für 45 min inkubiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Viren zu gewährleisten, wurden die Flaschen während der Inkubation alle 10 min geschwenkt. Die Verdünnung der Viren erfolgte in PBS⁺⁺/BSA (1 ml je T75-Zellkulturflasche), wobei das einzusetzende Virusvolumen wie folgt berechnet wurde:

$$\text{Zellzahl/Virustiter [pfu/ml]} * X \text{ MOI} * 1000 = \text{Volumen Virusstock [\mu l]}$$

Die Virusverdünnung wurde abgesaugt, die Zellen zweimal gewaschen und für 48 h in Infektionsmedium, welches mit 1 mg/ml TPCK-Trypsin versetzt war, inkubiert. Die abgenommenen Zellkulturüberstände wurden zentrifugiert (2500 rpm, 5 min) und abschließend aliquotiert bei -80 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.2.2.2 Bestimmung des Virustiters mittels Standardplaque Assay

Der Plaquetest ermöglicht die Bestimmung der Anzahl infektiöser IV Partikel in einer virushaltigen Lösung. Der ermittelte Virustiter wird als plaquebildende Einheit (*plaque forming unit*, pfu) angegeben und dient als Grundlage zur Berechnung der MOI für die Infektion von Zellkulturen.

MDCK-Zellen wurden in 12-well Kulturplatten ausgesät und bei Konfluenz mit Verdünnungen der zu überprüfenden Viruslösung infiziert (150 µl je 12-well, siehe Kapitel 2.2.2.1)). Die

Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-8}) wurden in 96-well Mikrotiterplatten auf Eis angefertigt. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Avicelmedium (versetzt mit 1 mg/ml TPCK-Trypsin) überschichtet und für 48 h inkubiert. Dabei verhindern die Avicelpartikel die freie Diffusion neugebildeter viraler Partikel, was dazu führt, dass diese ausschließlich angrenzende Zellen infizieren und es bei geeigneter Virusverdünnung zur Ausbildung von Plaques im Zellrasen kommt. Nach der 48 stündigen Inkubation wurde das Avicelmedium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Durch die Behandlung mit einer 0,1 % Kristallviolett/10 % Formaldehydlösung wurden die Zellen fixiert, die Plaques sichtbar gemacht und ausgezählt.

2.2.2.3 Anlegen von Pneumokokkenstöcken

Die Pneumokokken wurden mit einer sterilen Einwegöse im Dreistrichprinzip auf Columbia-Blutagarplatten (5 % Schafblut-Zusatz) ausgestrichen und für 8–9 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde auf die gleiche Weise aus einigen einzelnstehenden Kolonien ein Zweitausstrich angefertigt. Nach erneut etwa 9 h Inkubationszeit wurden alle Einzelkolonien einer Blutagarplatte mit einem sterilen, in Einfriermedium angefeuchteten Wattestäbchen abgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt, welches direkt bei -80°C gelagert wurde.

2.2.2.4 Animpfen der Pneumokokken

Die Kryoröhrchen mit den Pneumokokken wurden im Kühlblock transportiert und mit einer Einwegöse auf eine vorgewärmte Blutagarplatte ausgestrichen. Nach 8–9 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden einzelnstehende Kolonien mit einem Wattestäbchen in THY-Medium überführt. Die Bestimmung der Menge an überführten Bakterien erfolgte über die optische Dichte (OD) bei 600 nm mit einem Photometer, diese sollte 0,03–0,06 betragen. Bis zum Gebrauch wurde die Bakteriensuspension auf Eis gelagert oder direkt im Wasserbad bei 37°C bis zum Erreichen einer OD von 0,3–0,4 in der frühen *midlog*-Phase inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 10 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet im gleichen Volumen des entsprechenden Kulturmediums der zu infizierenden Probe resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurde eine Ausgangsverdünnung in Kulturmedium von 10^8 cfu/ml anhand folgender Rechnung erstellt:

$$OD \text{ von } 0,1 = 10^8 \text{ cfu/ml}$$

$$OD \text{ von } 0,3 = 3 \times 10^8 \text{ cfu/ml Suspension } 1:3 \text{ verdünnen}$$

Anschließend wurde die 10^8 cfu/ml haltige Suspension in Zehnerschritten in Kulturmedium auf die gewünschte Infektionskonzentration eingestellt. Um zu überprüfen, ob die initiale

Bakterienlast tatsächlich die richtige Konzentration an Pneumokokken enthielt, wurden Verdünnungen der gewünschten Konzentration in PBS erstellt, auf Blutagarplatten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte die tatsächliche initiale Keimlast anhand der gezählten Kolonien errechnet werden.

2.2.2.5 Wachstum des IAV Pan/99(H3N2) auf Lungenkulturen

Zur Überprüfung der Replikationseffizienz von Pan/99 im humanen Lungengewebe wurden die Lungenstücken zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann für 1,5 h bei RT mit einer Virusdosis von 4×10^5 pfu (verdünnt in RPMI-Medium, Gesamtvolumen 500 µl in 24-well-Kulturplatte) schwenkend inkubiert. Um eine gleichmäßige Infektion des Gewebes zu gewährleisten, wurden pro 100 mg Gewebe je 200 µl des mit Pan/99 versetzten Kulturmediums an verschiedenen Stellen der Gewebeprobe injiziert. Anschließend wurde das virushaltige Medium abgesaugt, die Lungenstücken zweimal mit PBS gewaschen und in 1,5 ml Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Nach 1, 16, 24 und 48 h Infektion wurden jeweils 100 µl Überstand genommen und durch eine entsprechende Menge an frischem Kulturmedium ersetzt. Zur Entfernung von Zelldebris wurde der Überstand zentrifugiert (2500 rpm, 5 min) und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.6 Wachstum von *S. pneumoniae* auf Lungenkulturen

Das Wachstum der beiden verwendeten *S. pneumoniae* Stämme D39 und ST3 wurde in An- und Abwesenheit von Pan/99 ermittelt. Die Lungenproben wurden zunächst mit Pan/99 (10^6 pfu, Abschnitt 2.2.2.5) und nach 24 h anschließend mit je einem der beiden *S. pneumoniae* Stämme (10^6 cfu/ml) infiziert. Dabei sind pro 100 mg Gewebe je 200 µl des pneumokokkenhaltigen Kulturmediums an verschiedenen Stellen injiziert worden. Nach der 16 stündigen bakteriellen Infektion wurden die Lungenkulturen direkt in LysingMatrixD-Röhrchen überführt (je Gefäß 1 ml PBS) und im Fastprep Homogenisator aufgeschlossen (4x 30 sec, 6 m/s, Modus: Custom, gekühlt). Im Anschluss sind geeignete Verdünnungen des Lysates (in PBS) auf Blutagarplatten aufgetragen und über Nacht bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert worden. Die Bestimmung der Keimlast erfolgte durch Auszählung der Kolonien.

2.2.2.7 Ex vivo Koinfektion humanen Lungengewebes

Für die Koinfektion wurde ein grundlegender Versuchsansatz, bestehend aus vier unterschiedlichen Probenbehandlungen verwendet. Dieser setzte sich aus einer nichtinfizierten

Kontrolle (1), alleiniger Infektion mit Pan/99 (2) bzw. *S. pneumoniae* (D39 oder ST3) (3) und der Koinfektion beider Erreger mit primärer viraler, gefolgt von sekundärer bakterieller Infektion (4) zusammen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Versuchsaufbau zur Koinfektion humaner Lungenkulturen

Nr.	Probe	Infektionsmuster	Abkürzung im Text
1	Nichtinfizierte Kontrolle	24 h Kulturmedium / 16 h Kulturmedium	Kontrolle
2	Pan/99 Einfachinfektion	24 h Pan/99 / 16 h Kulturmedium	Pan/99
3	<i>S. pneumoniae</i> D39 (bzw. ST3) Einzelfektion	24 h Kulturmedium/ 16 h <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i> D39 (bzw. ST3) (<i>S. p.</i> D39 bzw. ST3 in Abbildungen)
4	Koinfektion Pan/99/ <i>S. pneumoniae</i>	24 h Pan/99 / 16 h <i>S. pneumoniae</i>	Koinfektion

Nachdem die nach der in Kapitel 2.2.1.5 präparierten Lungenkulturen über Nacht in Kulturmedium inkubiert worden sind, erfolgte die primäre Infektion mit Pan/99 (10^6 pfu) methodisch entsprechend der in Kapitel 2.2.2.5 beschriebenen Vorgehensweise.

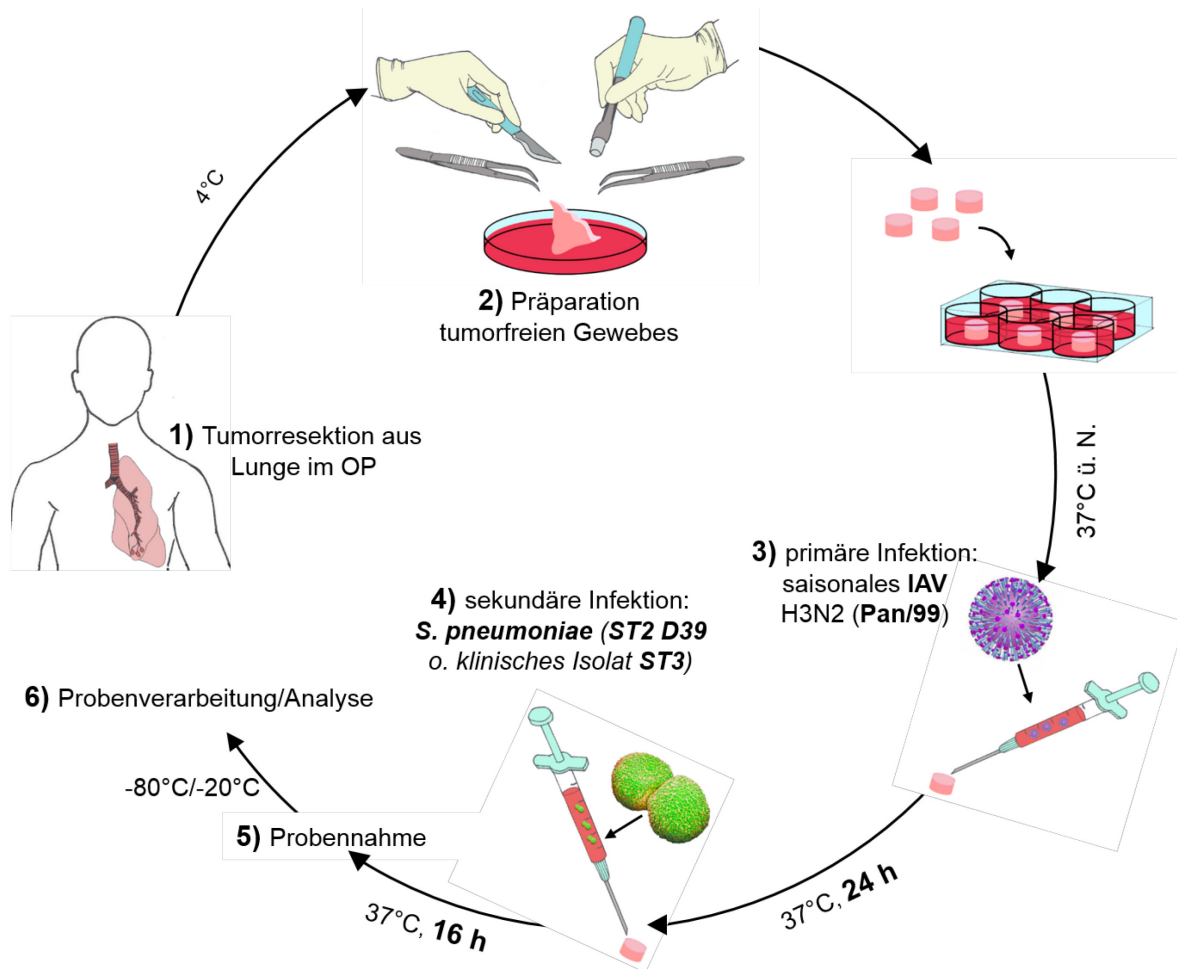


Abbildung 9: Versuchsaufbau der Etablierung eines humanen *ex vivo* Lungenkulturmodells zur Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion.

1) Infolge einer Tumorsektion wurde Lungengewebe steril im OP entnommen und unverzüglich bei 4°C in RPMI Medium ins Labor transportiert. 2) Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe zu zylindrische Lungenkulturen (150 mg, $8 \times 8 \times 3$ mm) präpariert und in Gewebekulturschalen mit Kulturmedium über Nacht inkubiert. 3) Die primäre Infektion erfolgte mit dem IAV Stamm Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) für 24 h. 4.) Anschließend wurden die Lungenkulturen sekundär mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert, alternativ wurde ein klinisches Isolat vom Serotyp 3 (10^6 cfu/ml) verwendet. 5) Nach weiteren 16 h Inkubation erfolgte die Entnahme und Verwahrung der Proben entsprechend ihrer 6) finalen Weiterverarbeitung und Analyse (Western Blot, ELISA/Bioplex, Zytotoxizitätstest, Wachstumsquantifizierung, Immunhistologie, etc.).

Für die Infektion in der 6-well-Kulturplatte erfolgte die Inokulation jedoch mit 2 ml virushaltigem Kulturmedium, für die anschließende Inkubationszeit wurden 4 ml Kulturmedium je Vertiefung zugegeben. Die nichtinfizierte Kontrolle und die ausschließlich mit *S. pneumoniae* infizierte Probe sind entsprechend der virusinfizierten Probe, jedoch mit Kulturmedium ohne IAV behandelt worden. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* D39 bzw. dem ST3 (10^6 cfu/ml). Auch hier wurden sowohl das bakterienhaltige als auch das pneumokokkenfreie Kulturmedium entsprechend der in Kapitel 2.2.2.5 beschriebenen Vorgehensweise in das Gewebe injiziert (Abb. 9). Nach 16 h wurden die

Überstände abgenommen und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Der geklärte Überstand wurde bei -20 °C aufbewahrt, das Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die histologische Analyse wurde das Gewebe direkt in 3% iges PFA überführt.

2.2.2.8 Infektion primärer AECII und AM mit dem IAV Pan/99(H3N2)

Frisch isolierte AECII wurden in 24-well Kulturplatten auf Glasplättchen ausgesät und die etwa 80-90 % konfluenten Zellen mit Pan/99 (MOI 1) für 24 h infiziert. AM wurden in 6-well Kulturplatten mit einer MOI von 1 infiziert. Die Infektion erfolgte gemäß der MDCK-Infektion (Kapitel 2.2.2.2) mit an die jeweilige Vertiefungsgröße angepassten Volumina, das Infektionsmedium enthielt jedoch kein TPCK-Trypsin.

Nach Beendigung der Infektionen wurden die Zellkulturüberstände zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C) und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden entweder für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert (Kapitel 2.2.4.2) oder für die Proteinextraktion lysiert (Kapitel 2.2.3.3).

2.2.2.9 *S. pneumoniae* Infektion von AECII- und AECI-ähnlich

Die Zellen wurden in 24-well Kulturplatten ausgesät, vor ihrer Verwendung zweimal mit PBS gewaschen und mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) für 16 h infiziert. Alternativ wurden Zellen für 16 h mit IL-1 β (5 ng/ml) stimuliert. Die Verdünnung von IL-1 β und der Pneumokokken erfolgte in Infektionsmedium.

2.2.2.10 Koinfektion primärer Zellen

Sowohl AECII als auch AM wurden entsprechend der in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Methode zur Virusinfektion von MDCK-Zellen mit Pan/99 (MOI 1) infiziert. Kontrollzellen und einfach pneumokokkeninfizierte Zellen wurden mit PBS⁺⁺ ohne Virusverdünnung behandelt. Nach 24 h Inkubation erfolgte die sekundäre Infektion mit *S. pneumoniae* D39 (MOI von 0,5) für 16 h. Die Verdünnung der Pneumokokken erfolgte in Infektionsmedium, Kontrollzellen und einfach virusinfizierte Proben wurden mit Infektionsmedium ohne Bakterien behandelt.

2.2.2.11 Interferonstimulation von AM

Studien der Arbeitsgruppe in *ex vivo* infiziertem humanem Lungengewebe zeigten, dass IAV nahezu ausschließlich AECII infizieren (Weinheimer, 2013), sodass isolierte AM anders als im

Gesamtgewebe keinen von den virusinfizierten AECII vermittelten Stimulus zur Interferonbildung bekommen würden. Um die interferonbedingten Effekte einer IAV Infektion in isolierte AM vereinfacht zu simulieren, wurden diese direkt mit einer Kombination aus IFN β und IFN γ (je 100 U/ml) stimuliert. Die Zellen wurden in einer 6-well Kulturplatte ausgesät, vor der Stimulation zweimal mit PBS gewaschen und für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml, verdünnt in Infektionsmedium) inkubiert. Kontrollen und einfach pneumokokkeninfizierte Zellen wurden mit in Infektionsmedium verdünntem PBS behandelt. Anschließend erfolgte die 16 stündige sekundäre Infektion mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 ELISA

Zur Quantifizierung der Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF α , IFN α , IFN β , IFN γ und IFN λ_1 in den Überstand infizierter Zell- oder Lungenkulturen wurden entsprechende kommerzielle „Sandwich“-ELISA-Kits (siehe Tabelle 13) nach Herstellerangaben verwendet. Prinzipiell binden entsprechende Zytokine an einen spezifischen Antikörper, welcher am Boden einer 96-well Platte sitzt. Nach der Antigenbindung wird ein weiterer spezifischer Antikörper zugegeben, der kovalent mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) verbunden ist. Die Bestimmung der Menge an gebildeten Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen erfolgt durch die Inkubation mit einem Substrat der HRP, welches anschließend im Photometer bei der entsprechenden Wellenlänge detektiert wird. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Winread V.3.2. Je nach ELISA wurden die Überstände entsprechend im jeweiligen Assaypuffer verdünnt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism6 verwendet.

2.2.3.2 Bioplex Assay

Die Bestimmung der sekretierten Zytokine IL-1 β , IL-10, GM-CSF, TNF α , IFN α_2 und IFN γ in den Überstand infizierter Lungenkulturen erfolgte mit einem Bioplex Assay der Firma BioRad. Der Vorteil besteht in der gleichzeitigen Detektion von bis zu 100 verschiedenen Zytokinen in einem Probenansatz. Die verwendeten Antikörper sind kovalent an fluoreszenzmarkierte Proteine gebunden. Binden Zytokine an die entsprechenden Antikörper, erfolgt die Inkubation mit einem weiteren, biotinylierten Antikörper, welcher ein anderes spezifisches Epitop der Zytokine erkennt. Durch Zugabe von Streptavidin können die gebildeten Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe detektiert werden. Die Lungenkulturüberstände wurden unverdünnt verwendet. Die Messung und Analyse erfolgte mit dem Bioplexreader und der entsprechenden

Analyse-Software (Version 4.1.) der Firma BioRad. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism6 verwendet.

2.2.3.3 Proteinextraktion

Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden erfolgten die Extraktionsschritte auf Eis. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 13000 rpm für 10 min bei 4 °C statt. Die finalen Proteinüberstände wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C verwahrt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit einem Bradford-Proteinassay nach Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurden die Lysate mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und zur Integration des Puffers für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert, bevor sie auf Eis abgekühlt und final bei -20 °C gelagert wurden.

Zellen

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese für 10 min mit Phospho-Zelllysepuffer (Tabelle 4) inkubiert und mittels eines Zellschabers abgelöst. Um die Proteine von Zelldebris zu befreien wurde das Lysat zentrifugiert und die Proteinüberstände abgenommen.

Lungengewebe

Nach der Bestimmung des Trockengewichtes der Lungenkulturen wurden sie in LysingMatrixD-Röhrchen überführt, in welche zuvor Phospho-Zelllysepuffer (Verhältnis 6:1, 600 µl Puffer je 100 mg Lungengewebe) vorgelegt wurden. Die Extraktion erfolgte in dem mittels Trockeneis gekühlten Fastprep Homogenisator (Modus: Custom, 6m/s, 3x30 sec). Das Lysat wurde zentrifugiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im geklärten Überstand.

2.2.3.4 Western Blot

Die Proteine wurden anhand ihres Molekulargewichts mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Unter Verwendung der Mini-Protean Gießvorrichtung wurde zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisation das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen. Bei den Lungengewebeproben wurden je 100 µg, bei den Zellversuchen je 40 µg Gesamtprotein je Probe eingesetzt. Die Auftrennung der mit 4x SDS-Ladepuffer versetzten Proben erfolgte bei 25 mA in vertikaler Orientierung in einer mit 1xSDS-Elektrophorsepuffer befüllten Laufapparatur. Im Anschluss wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine über ein

Tank-Blot-System entsprechend der Herstellerangaben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgt gekühlt bei 100 V für 1 h in methanolhaltigem 1x Transferpuffer und wurde anschließend durch Schwenken der Membranen in PonceauS-Lösung überprüft. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurde die Membran für die ECL basierte Detektion der Proteine für 1 h in 5 % Milchpulverlösung schwenkend bei RT inkubiert, für die LI-COR Odyssey basierte Detektion in Odyssey-Puffer. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C, je nach Detektionssystem entweder verdünnt in 5 % Milchpulverlösung oder Odysseypuffer. Die mehrfach in PBS-T gewaschene Membran wurde 1 h schwenkend bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Für die Detektion mittels ECL-Reagenz wurden in 5 % Milchpulverlösung verdünnte HRP-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, für das LI-COR-System in Odysseypuffer verdünnte fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper. Nach mehrfachem Waschen der Membranen in PBS-T erfolgte je nach System die Detektion direkt im LI-COR-Scanner bzw. die Membranen wurden nach Herstellerangaben in substrathaltigem ECL-Reagenz inkubiert und das erzeugte Chemilumineszenzsignal über einen Röntgenfilm visualisiert. Die Detektion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und des dazugehörigen Aktins erfolgte mittels LI-COR Odyssey, die von pro-IL-1 β und des dazugehörigen Aktins mittels ECL.

2.2.3.5 RNA-Extraktion aus Lungengewebe

Alle folgenden Zentrifugationen erfolgten bei 13000 rpm und soweit nicht anders vermerkt für 1 min unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Direct-zol RNA MiniPrep, ZYMO RESEARCH). Die Lungenkulturen wurden sofort nach Beendigung der Infektion in Trizol überführt und bei -80 °C gelagert. Der Aufschluss der Proben erfolgte auf Eis in Trizol unter Verwendung des Ultra-Turrax. Das Gewebehomogenat wurde in Trizol zentrifugiert, der Überstand überführt, 1:1 mit Reinstethanol versetzt und gevortext. Anschließend wurde das Lysat auf Extraktionssäulen verteilt (50 μ g Feuchtgewebe je Säule) und nach Herstellerangaben verarbeitet. Der DNase-Verdau (Tabelle 20) erfolgte bei RT für 15 min. Das finale RNA-Eluat wurde sofort auf Eis gestellt, die Konzentration mit dem Nadodrop bestimmt und die RNA-Proben bei -80 °C verwahrt.

Tabelle 20: DNase-Verdau

<i>Menge [μl]</i>	<i>Reagenz</i>
5	DNaseI
8	10xDNaseI Reaktionspuffer
3	DNase/RNase freies Wasser

64	RNA-Waschpuffer
= 80	Gesamtvolumen

2.2.3.6 cDNA-Synthese

RNA stellt keine Matrize für die DNA-Polymerase dar und kann somit nicht durch eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert werden. Das Enzym „Reverse Transkriptase“ (RNA-abhängige DNA-Polymerase) ermöglicht die Synthese von cDNA aus RNA, welche als Matrize für die PCR verwendet werden kann.

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des *High Capacity cDNA Reverse Transcription (HI-RT) Kit*. Für jeden Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA-Lösung in einem Gesamtvolumen von 10 µl RNase/DNase freiem Wasser verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit Mastermix (Tabelle 21) versetzt. Der Einsatz von „Random Hexamer Primern“ ermöglichte die Umschreibung der gesamten RNA in cDNA, so dass die cDNA als Matrize vieler Gene durch verschiedene Primer verwendet werden kann.

Tabelle 21: HI-RT Versuchsansatz

<i>Menge gesamt [µl]</i>	<i>Menge [µl]</i>	<i>Bezeichnung</i>
10		Mastermix
+	4,2	RNase/DNasefreies Wasser
	2,0	10xRT-Puffer
	0,8	25xdNTP Mix
	1,0	<i>Random Hexamer</i> Primer
	1,0	RNase Inhibitor
	1,0	<i>Multiscribe</i> Reverse Transkriptase (50 U/µl)
10		RNA-Template/Wasser-Verdünnung
	x	RNA-Lösung [1 µg]
	x	RNase/DNase freies Wasser
=20		Gesamtvolumen

Die RT-Reaktion erfolgte im Thermocycler unter Verwendung folgenden RT-Programmes (Tabelle 22):

Tabelle 22: RT-Reaktionsprogramm im Thermocycler

<i>Schritt</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur [°C]</i>
1	10 min	25
2	120 sec	37
3	5 sec	85
4	∞	4

Final wurden die 20 µl des generierten cDNA-Ansatzes mit 80 µl 1:5 mit RNA/DNA freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C verwahrt.

2.2.3.7 Quantitative real-time PCR

Für die quantitative *real-time*-PCR (RT qPCR) wurden TaqMan Assaysonden verwendet, welche auf dem Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) basieren (Cardullo, 1988). Ein kurzwelligerer Fluoreszenzfarbstoff (Donor) wird angeregt und überträgt Energie auf einen zweiten, langwelligeren Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor), welcher dadurch heller emittiert. Voraussetzung dafür ist eine räumliche Nähe von ≤ 10 nm zwischen Donor und Akzeptor. Die für die Zielsequenz spezifische TaqMan-Probe besteht aus einem Oligonukleotid, welches an seinem 5'-Ende mit dem Donor und einem Quencher (Akzeptor) an seinem 3'-Ende markiert ist (Heid, 1996). Während der PCR hybridisiert die TaqMan-Probe an die von beiden Primern flankierte Zielsequenz und das 5'-Ende der TaqMan-Probe wird aufgrund der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Polymerase während der Synthese des Neustranges abgespalten (Holland, 1991). Dadurch werden Donor und Akzeptor räumlich getrennt und das bisher vom Quencher unterdrückte Fluoreszenzsignal wird emittiert. Bei den verwendeten TaqMan Sonden wurde der Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Corboxy-Fluorescein) als Donor und TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) als Akzeptor eingesetzt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 15 µl Mastermix in 96-well RT-PCR Platten gegeben und mit 5 µl der cDNA-Verdünnung auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Real-Time PCR Ansatz

<i>Menge [µl]</i>	<i>Reagenz</i>
10	TaqMan Mastermix
1	TaqMan Sonde
4	RNAse/DNAse freies Wasser
5	cDNA-Verdünnung
=20	Gesamtvolumen

Die Reaktionsplatte wurde mit Folie versiegelt und vor Beginn der RT-PCR kurz zentrifugiert (1000 rpm, 30 sec), in den RT-Cycler gestellt und mit nachfolgendem Programm prozessiert (Tabelle 24).

Tabelle 24: Real-Time PCR Programm

<i>Schritt</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Wiederholungen</i>
1	10 min	95	

2	15 sec	96	Je 40x
3	60 sec	60	

Grundlage zur Quantifizierung des PCR-Produktes ist die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem *Cycle Threshold* (Ct-Wert), der den PCR-Zyklus anzeigt, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Jeder neusynthetisierte Strang emittiert ein Fluoreszenzsignal, so dass die Intensität der Emission direkt proportional zur Anzahl neugebildeter Moleküle ist. Da die Amplifikation vielfältig beeinflusst wird (Bustin, 2000), ist die Vermehrungsrate bestimmter Fragmente nicht genau zu bestimmen. Für die Auswertung der Genexpression eignet sich daher die Methode der relativen Quantifizierung, mit welcher Veränderungen eines sich im Gleichgewicht befindlichen Systems erfasst werden können. Diese Methode bedarf weder der Erstellung einer Standardkurve, noch muss die Konzentration des zu bestimmenden Fragments bekannt sein (Bustin, 2000). Die unbekannte Menge an cDNA (RNA) der Zielsequenz in einer zu testenden Probe wird zu der einer oder mehrerer weiterer Proben ins Verhältnis gesetzt und semiquantitativ bestimmt. Für die Auswertung wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) verwendet. Neben der Zielsequenz wird ein Referenzgen, die endogene Kontrolle, amplifiziert und die Genexpression des Zielgens auf die des ubiquitär und konstant exprimierten Referenzgens bezogen. Durch die Normalisierung verringert sich die Varianz der Ergebnisse, da Gewebe- oder Matrixeffekte, unterschiedliche Effizienz bei der Extraktion der RNA sowie Fehler bei der RT innerhalb einer Probe Ziel- und Referenzgen gleichermaßen betreffen. In dieser Studie ist Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen eingesetzt worden.

2.2.4 Immunohistologie

2.2.4.1 Probengewinnung

Die in Gewebekapseln überführten Lungenkulturen wurden in PBS gepuffertem 4 %igem Formaldehyd fixiert, die Dauer der Fixierung betrug 12 - 72 h. Im Anschluss erfolgte eine automatisierte Paraffineinbettung (freundlicherweise durchgeführt in Kooperation am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, AG Prof. Dr. Achim Gruber). Das prinzipielle Vorgehen ist in Tabelle 25 dargestellt. Die generierten Paraffinblöcke wurden mittels eines Schlittenmikrotoms in etwa 10 μ m dicke Paraffinschnitte geschnitten, die auf Objektträgern fixiert und für 1 h bei RT getrocknet wurden.

Tabelle 25: Schritte der automatisierten Paraffineinbettung von Gewebeproben

Inkubationsreagenz	Zeit	Wiederholungen
10 %iges Formalin	1 h	
Leitungswasser	45 min	
70 %iger Ethanol	45 min	
85 %iger Ethanol	45 min	
96 %iger Ethanol	45 min	2
Isopropanol	1 h	2
Essigsäure-n-Butylester	1 h	2
Paraplast Plus	1 h (60 °C)	4

2.2.4.2 Durchführung der Immunhistochemie

Für die Entparaffinierung wurden Objektträger mit den Lungengewebeschnitten in dem Xylolersatzstoff Roticlear inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 26). Bei der Fixierung in Formalin kommt es häufig durch Proteinquervernetzungen zur Verdeckung von Antigenen, welche die Detektion durch entsprechende Antikörper verhindern. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Gewebeschnitte in Tris-EDTA Puffer für 30 min bei 96°C gekocht (*antigen retrieval*). Die auf RT abgekühlten Schnitte wurden dreimal 5 min schwenkend (100 rpm) in PBS gewaschen. Um im Zytoplasma lokalisierte Zielantigene detektieren zu können erfolgte eine Permeabilisierung der Gewebeschnitte in 1 %iger Triton-X-100-Lösung (verdünnt in PBS), schwenkend (100 rpm) für 15 min. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation bei RT mit 5 %igem Ziegenserum (erstellt in Verdünnungsmedium) blockiert. Die einmal abgespülten Schnitte wurden mit einem in Verdünnungsmedium entsprechend konzentrierten primären Antikörper über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert, am nächsten Tag wie beschrieben dreimal in PBS gewaschen und mit dem in Verdünnungsmedium verdünnten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (1:2000) erneut über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Wieder wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen, anschließend zur Färbung der Zellkerne für 5 min bei RT mit DAPI Lösung in der Feuchtkammer inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Die Lagerung der mit durchsichtigem Nagellack versiegelten Schnitte erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

Tabelle 26: Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeproben

<i>Inkubationsreagenz</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
Roticlear	15 min	3
100 %iger Ethanol	15 min	
100 %iger Ethanol	1 min	
96 %iger Ethanol	10 min	
80 %iger Ethanol	5 min	
70 %iger Ethanol	5 min	
50 %iger Ethanol	5 min	
PBS	5 min	3

2.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zur indirekten Immunfluoreszenzanalyse primärer humaner Zellen wurden diese auf Glasplättchen ausgesät, für 20 min in 3 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und entsprechend der entparaffinierten Gewebeschnitte (ohne Antigendemaskierung) behandelt (vergleiche Kapitel 2.2.4.2). Final wurden die Deckgläschen mit der Zellseite in Mowiol auf Deckgläschen aufgebracht, mit Nagellack versiegelt und ebenfalls im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

2.2.4.4 Primäre Fluoreszenzkopplung des Influenza A Antikörpers

Für die Markierung wurde ein anti-IAV-Antikörper (siehe Tabelle 10) und das „Alexa Fluor 488-DyLight™ Microscale Antibody Labeling Kit“, entsprechend Herstellerangaben verwendet. Im Dunkeln aufbewahrt konnte der fluoreszenzmarkierte Antikörper für zwei Wochen bei 4 °C, alternativ aliquotiert bei -20 °C gelagert werden. Die Färbung von IAV in humanen Lungen erfolgte wie in 2.2.4.2 beschrieben unter Auslassung des Inkubationsschrittes mit dem Sekundärantikörper.

2.2.4.5 Spektrale konfokalmikroskopische Dokumentation

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Anregung von Fluorochromen mit kurzwelligerem Licht, welche daraufhin langwelligeres Licht emittieren. Aufgrund der Schnittdicke der Lungengewebepräparate von etwa 10 µm wird bei dieser Anregung das Licht aus allen optischen Ebenen emittiert, sodass nicht in der Fokusebene liegende Lichtsignale zu einer unscharfen Bilddarstellung führen (sog. Weitfeldfluoreszenz). Bei Verwendung eines Konfokalmikroskops wird das Präparat punktgenau gescannt, wodurch der Streulichteffect minimiert wird. Über eine vor dem Detektor angebrachte Blende (*Pinhole*) wird Licht, welches außerhalb der zu fokussierenden Ebene liegt, ausgeblendet und eine schärfere Darstellung ermöglicht, wobei jedoch die Bildauflösung unbeeinflusst bleibt.

Ein besonderes Problem humanen Lungengewebes ist der hohe Anteil an Kollagenfasern und die daraus resultierende Autofluoreszenz, welche die spezifischen Spektren verwendeter Fluorochrome überlagert. Liegen spezifische Immunfluoreszenzsignale unterhalb des Intensitätsniveaus der Autofluoreszenz gehen diese verloren. Da die Autofluoreszenz der menschlichen Lunge das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts überlagert, würde dies die spezifische Immunfluoreszenz im Lungengewebe erheblich beeinträchtigen. Zur Umgehung des Problems wurde ein mikroskopisch mathematisches Verfahren verwendet, welches darauf beruht, dass jedes emittierte Spektrum anhand von zuvor gemessenen Referenzspektren in seine einzelnen Komponenten zerlegt werden kann (Zimmermann, 2005) um Mischpixel in seine spektralen Einzelkomponenten aufzutrennen. Um dies zu gewährleisten, müssen die Referenzspektren der gewünschten Fluorophore vor der eigentlichen Dokumentation der Präparate vermessen werden. Dieses Verfahren wird als „lineares spektrales Entmischen“ (*Spectral Imaging and Linear Unmixing*) bezeichnet. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird mittels eines Prismas in das gesamte Wellenlängenspektrum zerlegt und anschließend über einen Spektraldetektor mit 32 Kanälen etwa 8 nm breiten Bildkanälen (λ -Kanäle) zugeordnet. Mittels eines computerbasierten linearen Entmischungsalgorithmus und der gemessenen Referenzspektren der eingesetzten Fluorochrome sowie der Autofluoreszenz können die Anteile der verschiedenen Fluoreszenzen sich überlagernder Spektren in jedem Bildpixel errechnet und voneinander getrennt werden. Alle Färbungen wurden mit dem LSM 780 Konfokalmikroskop dokumentiert. Folgende Objektive fanden Verwendung: Plan-Neofluar, 40x, NA 1.3 und PlanApochromat, 63x, NA 1.4, Zeiss, Jena, DE.

2.3 Statistische Auswertung

Alle Proben wurden in biologischen Duplikaten erstellt, lediglich der Zytotoxizitätstest erfolgte unter Verwendung von Triplikaten. Jede Versuchsreihe besteht aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen des Experiments, die genaue Zahl ist jeweils in der Legende der einzelnen Abbildungen angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® Version 6.0. Zur graphischen Darstellung wurde der arithmetische Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) der jeweiligen Versuchsreihe graphisch dargestellt. Aufgrund der Wiederholungsgröße $n < 10$ wurden alle Proben im *D'Agostino and Pearson Omnibus Normality*-Test als nichtnormalverteilt getestet. Zur Analyse der Daten wurde der *Mann-Whitney U-Test* verwendet. Statistische Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: n.s. nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Modells humaner *ex vivo* Lungengewebekulturen zur Analyse der Influenza A Virus assoziierten sekundären Pneumokokkenpneumonie

3.1.1 Pathogenwachstum in humanem Lungengewebe

Das *ex vivo* Modell humaner Lungengewebekulturen wurde bereits erfolgreich zur Analyse viraler (Weinheimer, 2012; Hocke, 2013) und bakterieller Infektionen eingesetzt (Szymanski, 2012; Fatykhova, 2015). Für die Etablierung des *ex vivo* Koinfektionsmodells wurde zunächst das Wachstum der verwendeten Erreger, das saisonale IAV Pan/99(H3N2), *S. pneumoniae* D39 sowie ein alternativ eingesetztes klinisches *S. pneumoniae* Isolat ST3, überprüft. Voraussetzend für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war eine kontrollierbare Infektion des Lungengewebes mit beiden Pathogenen, IAV und *S. pneumoniae*.

3.1.1.1 Replikation von Pan/99(H3N2)

Humanes Lungengewebe wurde mit Pan/99 (4×10^5 pfu) infiziert. Die Anzahl infektiöser Partikel wurde in zu festgelegten Zeitpunkten (1, 16, 24 und 48 h) entnommenen Kulturüberständen mittels Plaque Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

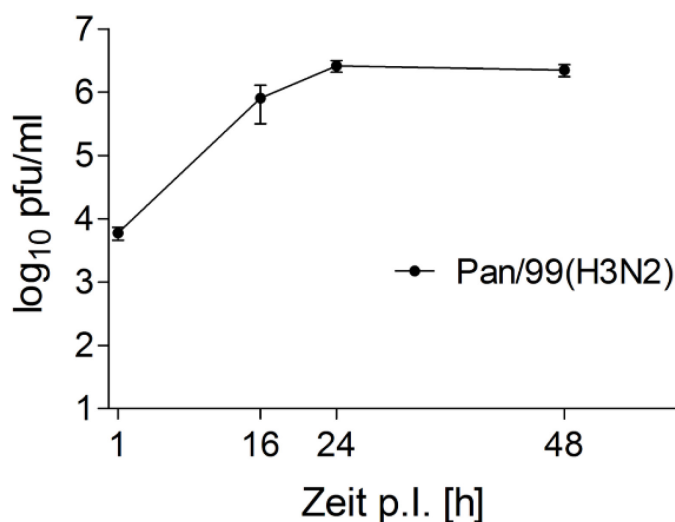


Abbildung 10: Replikation des saisonalen IAV Pan/99 in *ex vivo* infizierten Lungenkulturen.

Lungenkulturen wurden mit dem IAV Stamm Pan/99(H3N2) (4×10^5 pfu) infiziert und die Anzahl infektiöser Partikel im Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Plaque Assay auf MDCK bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 12 unabhängigen Experimenten.

In der generierten Wachstumskurve zeigte sich, dass Pan/99 im Zeitraum von 8 – 24 h nach Infektionsbeginn effizient im Lungengewebe replizierte. Nach etwa 24 h erreichte die virale Replikation ein Plateau bei maximal 2×10^6 pfu/ml, welches im weiteren Verlauf der Wachstumsmessung nicht mehr überschritten wurde. Tendenziell war 48 h nach

Infektionsbeginn vielmehr ein geringfügiger Abfall auf etwa 10^6 pfu/ml zu verzeichnen (Abb. 10). Die in den Replikationskurven im Durchschnitt gebildete maximale Menge an infektiösen, viralen Partikeln von 10^6 pfu/ml diente als initiale Viruslast für alle weiteren Koinfektionsversuche. Dadurch sollte es in dem kurzen Zeitfenster der primären IAV zu einer schnellen und effizienten Reaktion des Immunsystems auf die hohe Erregerlast kommen, welche dennoch dem pathophysiologischen Wachstum der Viren in den Lungenkulturen entsprach.

3.1.1.2 Wachstum von *S. pneumoniae*

Zur Untersuchung von Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf die sekundäre bakterielle Pneumonie, durfte die vorhergehende IAV Infektion das Wachstum der Bakterien nicht unterdrücken bzw. negativ beeinflussen. Dieses wurde in An- und Abwesenheit von Pan/99 überprüft, mit welchem die Lungenkulturen 24 h vor der Infektion mit dem jeweiligen Pneumokokkenstamm inokuliert wurden.

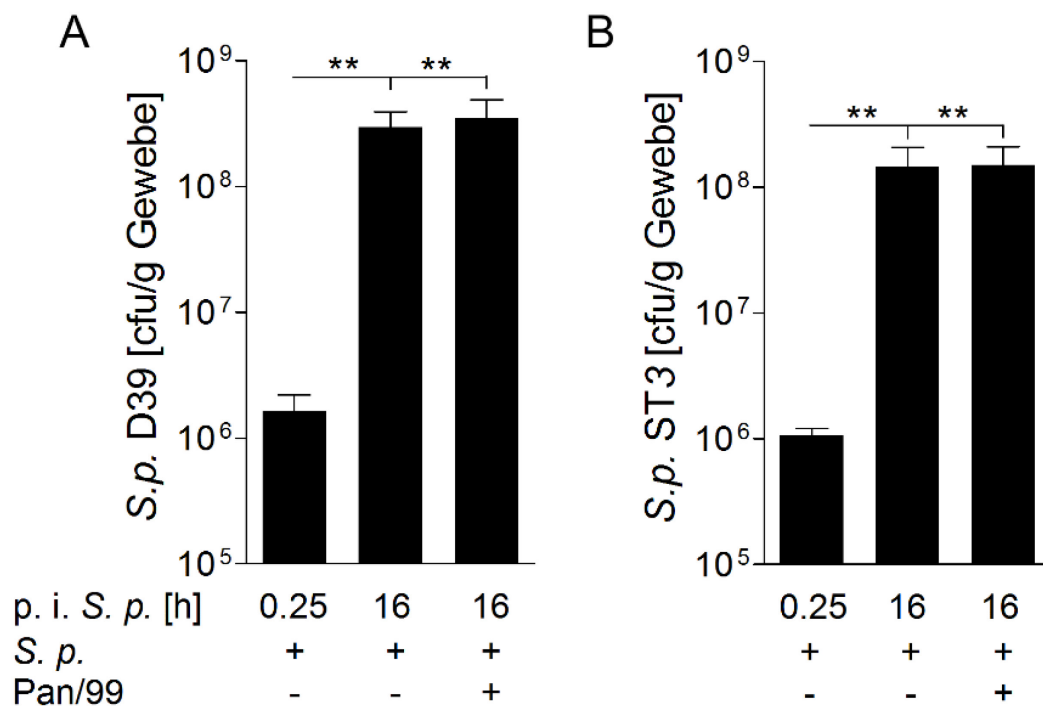


Abbildung 11: Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae* ohne und in Abhängigkeit von IAV in *ex vivo* infizierten Lungenkulturen.

Lungenkulturen \pm 24 h vorangegangener Infektion mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) wurden für 16 h mit (A) *S. pneumoniae* D39 bzw. (B) einem klinischen Isolat vom Serotyp 3 (ST3) infiziert (10^6 cfu/ml). Das Gewebe wurde steril im Fastprep-Homogenisator aufgeschlossen, in PBS verdünnt und geeignete Verdünnungen auf Blutagarplatten ausgebracht. Nach 24 h erfolgte die Bestimmung des bakteriellen Wachstums durch Auszählen der Kolonien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus (A) sechs bzw. (B) fünf unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Mann-Whitney-Test).

D39 (Serotyp 2)

Um eine schnelle Immunantwort zu erhalten, wurden die Lungenstücken mit einer hohen initiativen Erregerlast von 10^6 cfu/ml infiziert. Innerhalb der 16 stündigen Infektionszeit vermehrte sich *S. pneumoniae* D39 um etwa 2,5 Log-Stufen auf eine maximale Bakterienlast von durchschnittlich 5×10^8 cfu/g Gewebe. Eine vorherige Infektion des Gewebes mit Pan/99 (10^6 pfu) hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von D39 (Abb. 11A).

Klinisches Isolat (Serotyp 3)

Der *S. pneumoniae* ST3 wurde eingesetzt, um die mit D39 erhaltenen Resultate auf ihre pathophysiologische Gültigkeit hin zu überprüfen. Mit einer maximal erreichten Bakterienlast von etwa 2×10^8 cfu/g Gewebe innerhalb der 16 stündigen Infektionszeit, war das Wachstum des ST3 ähnlich dem von *S. pneumoniae* D39. Die Keimlast von *S. pneumoniae* D39 war bei gleicher Ausgangsinfektionsdosis geringfügig höher als die von *S. pneumoniae* ST3. Auch hier blieb die vorherige Infektion mit Pan/99 ohne Einfluss auf das bakterielle Wachstum (Abb. 11B).

3.1.2 Zytotoxizität in *ex vivo* koinfizierten Lungenkulturen

Neben dem gleichmäßigen Erregerwachstum bedingt das Vorliegen von intaktem, lebendem Gewebe maßgeblich die Reproduzierbarkeit der Versuche und die damit einhergehende Analyse der Ergebnisse. Eine zu hohe Belastung des Gewebes mit Pathogenen kann eine erhöhte zytotoxische Aktivität, u.a. durch Nekrose, im Gewebe auslösen. Aufgrund dieser sind falsch-positive bzw. falsch-negative Messergebnisse möglich, indem beispielsweise ein geringerer Prozentsatz an Zellen an der Immunantwort teilnimmt. Als Maß für den Verlust der Membranintegrität wurde die enzymatische Aktivität der ausschließlich zytosolisch vorkommenden Laktatdehydrogenase (LDH) in den Überstand sowie dem Lungengewebe ermittelt und als Marker für die Zytotoxizität verwendet. Humane Lungenkulturen wurden entsprechend des in Abb. 9 dargestellten Schemas primär für 24 h mit Pan/99 (10^6 pfu) und subsequent für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Als Kontrollen dienten die Einzelinfektionen mit dem jeweiligen Pathogen bzw. die nichtinfizierte Probe. Anschließend erfolgte die Messung der LDH Freisetzung in den Überständen und im Gewebe zur Ermittlung des Maßes an Zytotoxizität. Verglichen mit der nichtinfizierten Kontrolle zeigten die drei infizierten Proben (Pan/99, *S. pneumoniae* D39, koinfiziert) einen ähnlichen Anstieg der Zytotoxizität von durchschnittlich 12 % auf etwa 15 % (Abb. 12A). Basierend darauf konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede bezüglich der Immunantworten

zwischen den Proben auf einem unterschiedlichen Niveau zytotoxischer Effekte beruhen. Die Quantifizierung von TNF α im Überstand derselben Proben zeigte, dass die *S. pneumoniae* induzierte Freisetzung von der vorhergehenden Infektion mit IAV unbeeinflusst blieb (Abb. 12B).

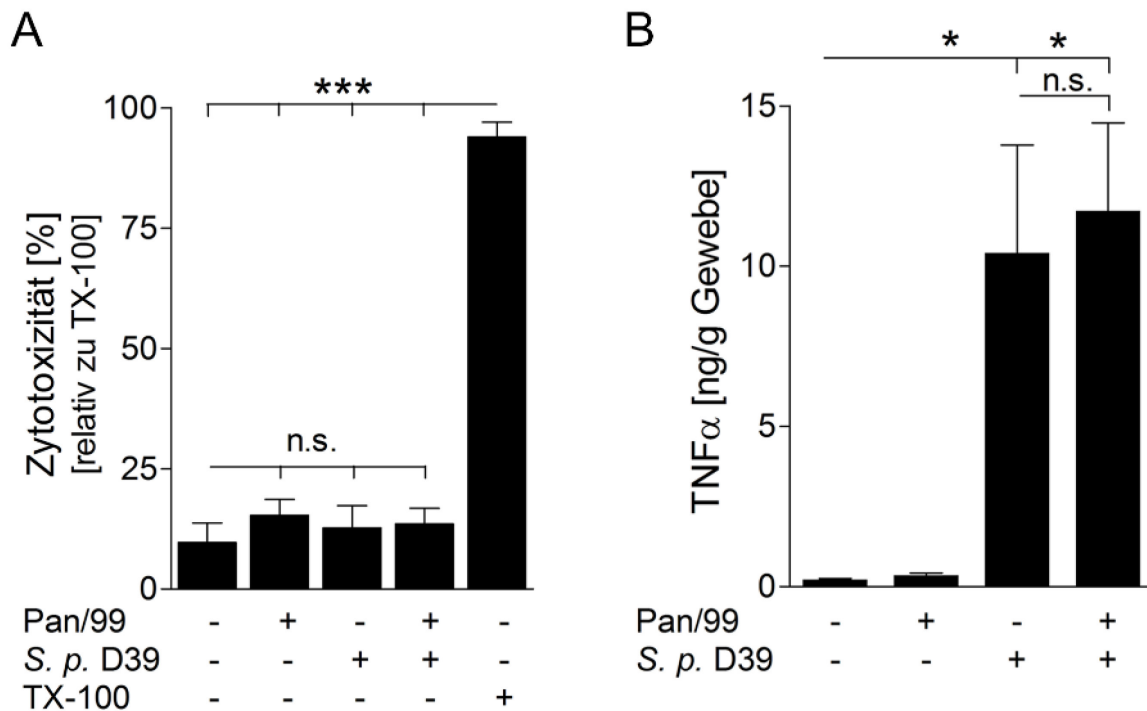


Abbildung 12: Zytotoxizität in *ex vivo* koinfizierten Lungenkulturen.

Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99 (10^6 pfu) und darauffolgend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten, den einzelnen IAV oder *S. pneumoniae* D39 infizierten Proben anstelle des jeweils zweiten Erregers Kulturmedium injiziert. (A) Als Zytotoxizitätsindikator wurde eine weitere Probe für den gesamten Zeitraum in Kulturmedium mit 10 % Triton-X-100 (TX-100) kultiviert. Nach Beendigung der Infektionszeit wurden Überstände und Gewebeprobe auf ihren Gehalt an LDH getestet. Die berechnete Zytotoxizität [Zytotoxizität [%] = LDH Aktivität (ÜS)/(LDH Aktivität (Lysat)+LDH Aktivität (ÜS)) x 100] wurde in Relation zur Triton-X-100 Probe dargestellt. (B) Zusätzlich wurde in den entnommenen Überständen die sekretierte Menge an TNF α mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei verschiedenen Patientenproben. (***) $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

3.1.3 Histologische Analyse koinfizierter Lungenkulturen

Um das Gewebe auch morphologisch hinsichtlich der Infektion und seinem Erhalt beurteilen zu können, wurden entsprechend des in Tabelle 19 beschriebenen Versuchsaufbaus infizierte Lungenproben fixiert und immunhistologisch gefärbt (Abb. 13 A-D). Die mikroskopische Begutachtung der Proben anhand der DAPI Färbung (orangefarbener Kanal) zeigte, dass alle Proben eine intakte Kernmorphologie aufwiesen. Eine Färbung gegen pro-Surfactant Protein C (pro-SP-C, blauer Kanal), einem Marker für AECII, bestätigte, dass diese in allen Proben gleichermaßen intakt im Zellverband integriert waren (Abb. 13 A-D). Durch die zusätzliche

Färbung gegen Influenza A virales Antigen (grüner Kanal) und den *S. pneumoniae* Serotyp 2 (roter Kanal) konnte das Infektionsverhalten beider Pathogene visualisiert werden.

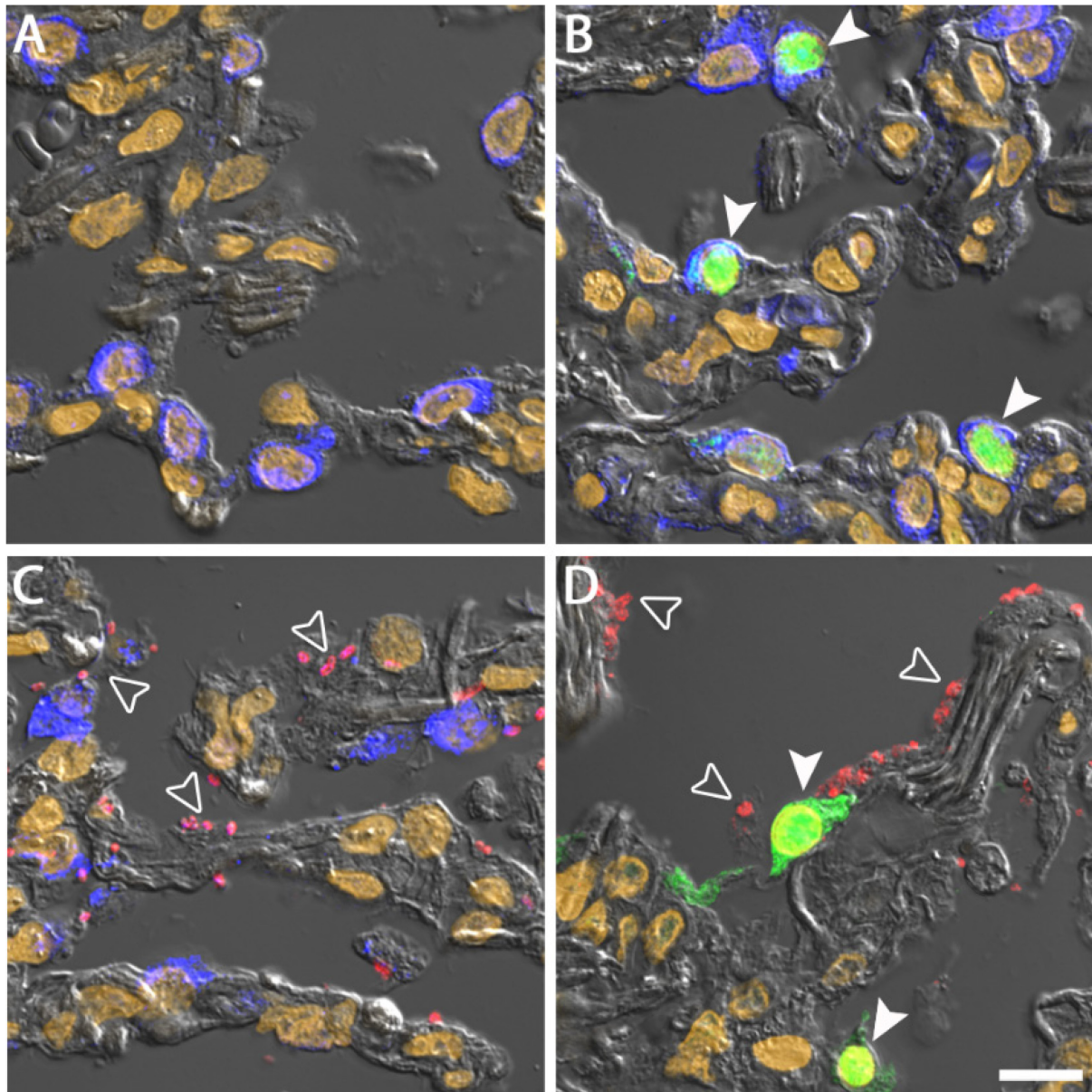


Abbildung 13: Immunhistologische Lokalisierung von IAV und *S. pneumoniae* in infiziertem humanem Lungengewebe.

Humane Lungenproben wurden entweder mit (A) Kulturmedium, (B) für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu), (C) für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (106 cfu/ml) oder subsequent (D) mit beiden Erregern (24 h Pan/99 + 16 h *S. pneumoniae* D39) infiziert. In Proben mit lediglich einem Erreger wurde Kulturmedium anstelle des zweiten Erregers injiziert. Nach Fixierung der Proben wurden diese für die immunhistologische Analyse aufbereitet, gegen pro-SP-C (blau), IAV Antigen (grün) und *S. pneumoniae* Serotyp 2 (rot) gefärbt und mittels spektraler Konfokalmikroskopie analysiert. (B, D) Charakteristisch für IAV repliziert Pan/99 in AECII (weiße Pfeilspitzen), die Kolokalisation des AECII Markers pro-SP-C und IAV Antigen ist gelb dargestellt. (C, D) *S. pneumoniae* D39 zeigte sich nah angeheftet am respiratorischen Epithel (offene Pfeilspitzen). Die Lungenstruktur (grau) wurde mit Hilfe von Differentialinterferenzkontrast und Zellkerne durch eine DAPI Färbung (orange) sichtbar gemacht. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von drei Patientenproben. Maßstab: 20 µm.

Keiner der beiden Erreger wurde in der nichtinfizierten Kontrolle detektiert (Abb. 13A). In der mit Pan/99 infizierten Probe zeigte sich in der Infektion pro-SP-C positiver AECII, der für IAV typische Zelltropismus (Weinheimer, 2012) (Abb. 13B).

In der einzeln mit *S. pneumoniae* D39 infizierten und auch in der mit Pan/99 koinfizierten Probe infizierten die Pneumokokken das respiratorische Epithel. Dabei fanden sich die Pneumokokken sowohl in unmittelbarer Nähe zu AECII und AECI (Abb. 13C und 13D) als auch zu AM (Abb. 13C). Beide Pathogene wurden in der koinfizierten Probe detektiert, einige Lungenareale waren mit Pan/99 und *S. pneumoniae* D39 infiziert, andere nur mit einem der beiden Erreger. Auch hier zeigte sich der für IAV typische Zelltropismus, resultierend in der gelb dargestellten Kolo-kalisation von viralem Antigen und pro-SP-C der AECII (Abb. 13D).

3.2 Quantifizierung Influenza AVirus - und *S. pneumoniae* induzierter Zyto- und Chemokine

3.2.1 Pan/99(H3N2) induziert Typ I, II und III Interferone in humanen Lungenkulturen

Das angeborene Immunsystem von Vertebraten reagiert auf virale Infektionen mit der Freisetzung von Interferonen, welche durch ihre Bindung an spezifische Rezeptoren sowohl die Transkription antiviraler als auch immunmodulatorischer und antiproliferativer Proteine aktivieren (Pestka, 1987). Um zu überprüfen, ob es nach der Infektion mit Pan/99(H3N2) zu einer effizienten Freisetzung von Interferonen und somit zu einer adäquaten Immunantwort in den *ex vivo* infizierten Lungenkulturen kommt, wurden ausgewählte Vertreter der einzelnen Interferontypen I, II und III im Überstand der Lungenkulturen quantifiziert. Dafür wurden erneut Lungenkulturen entsprechend des in Tabelle 19 beschriebenen Infektionsschemas primär für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und subsequent für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Pan/99(H3N2) induzierte in den Lungenkulturen sowohl die Freisetzung von IFN α 2 (Abb. 14A) und IFN β (Abb. 14B) (Typ I IFN) als auch die von IFN γ (Abb. 14C) (Typ II IFN) und IFN λ 1 (Abb. 14D) (Typ III IFN). Die durch die IAV Infektionen freigesetzten Mengen an IFN γ waren fast 150x höher als die von IFN α 2, IFN β und IFN λ 1.

Die sekundäre Infektion mit *S. pneumoniae* D39 blieb ohne Einfluss auf die Menge der gemessenen Interferone. Weder in der nichtinfizierten Kontrolle noch in der allein mit *S. pneumoniae* D39 infizierten Probe wurde die Induktion von IFN α 2, IFN β , IFN γ oder IFN λ 1 detektiert. Die durch die Infektion mit IAV freigesetzte Menge an war zu IFN α 2, IFN β und IFN λ 1 fast 150x höher waren im Vergleich.

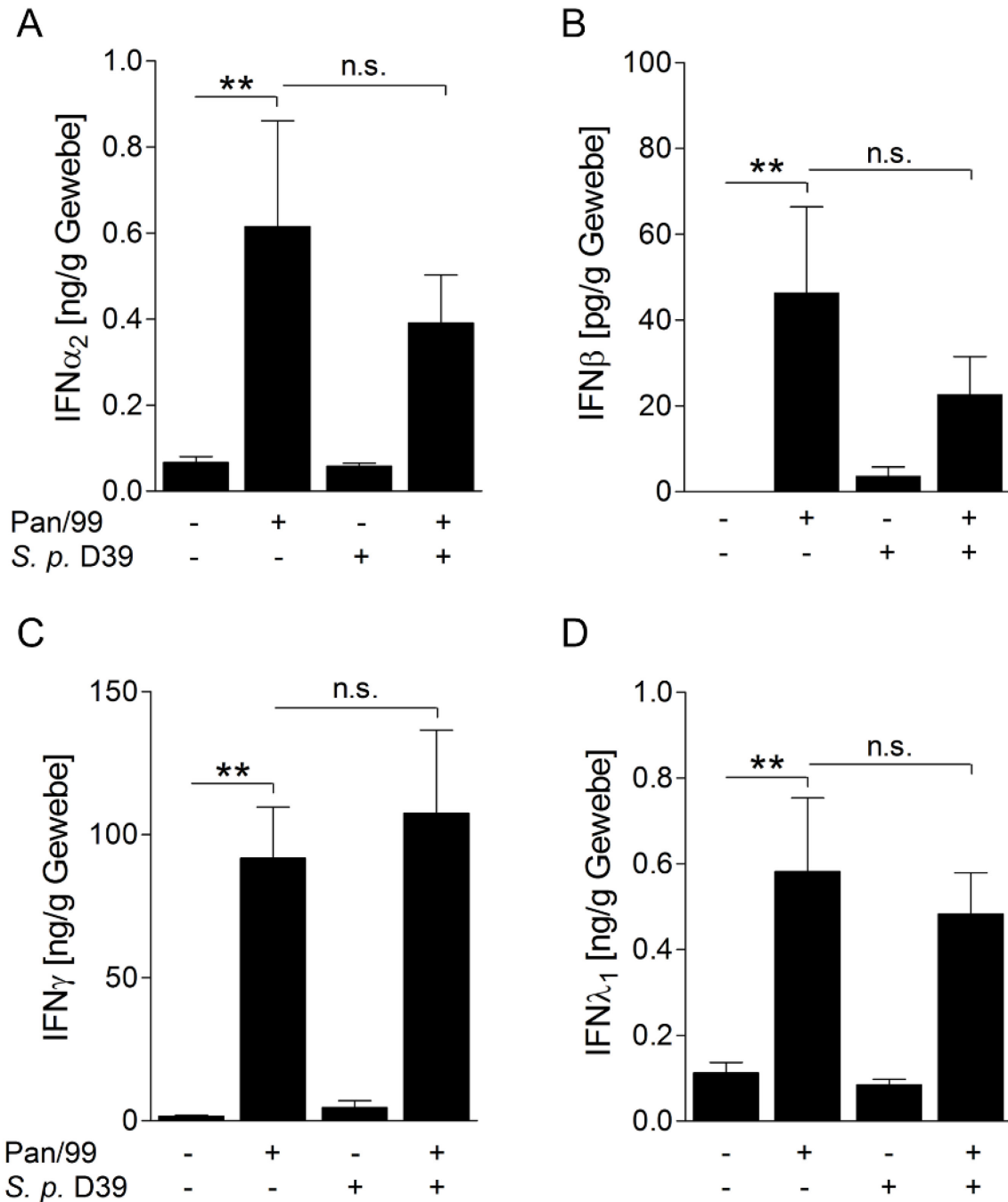


Abbildung 14: IAV induzierte Interferonfreisetzung in Lungenkulturen.

Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten und den einzeln infizierten Proben anstelle des zweiten Erregers zum jeweils entsprechenden Zeitpunkt Kulturmedium injiziert. Nach Beendigung der Infektion wurden in den Kulturüberständen die Mengen an gebildetem Typ I, II und III IFN in Form von (A) IFN α_2 , (B) IFN β , (C) IFN γ und (D) IFN λ_1 mittels (A, C) Bioplex und (B, D) ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs verschiedenen Patientenproben. (**p<0,01; ***p<0,001, Mann-Whitney-Test).

3.2.2 Pan/99(H3N2) inhibiert die *S. pneumoniae* induzierte Freisetzung von IL-1 β und GM-CSF

Die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen. Verschiedene Studien in Mäusen zeigten, dass sich das bakteriell induzierte Sekretionsprofil einiger dieser Mediatoren durch eine vorhergehende Virusinfektion veränderte. Betroffen waren dabei sowohl anti- (IL-10) als auch proinflammatorische (u.a. IL-6, TNF α) Zytokine (van der Sluijs, 2004; Smith, 2007). Um Aussagen darüber treffen zu können, ob die vorangegangene IAV Infektion die Immunantwort des humanen Lungengewebes auf *S. pneumoniae* beeinflusst, wurde die Freisetzung bekannter bakteriell induzierter Zyto- und Chemokine in den Überständen der einzeln mit Pan/99 (10^6 pfu) oder *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) bzw. der mit beiden Erregern koinfizierten Lungenproben quantifiziert und verglichen.

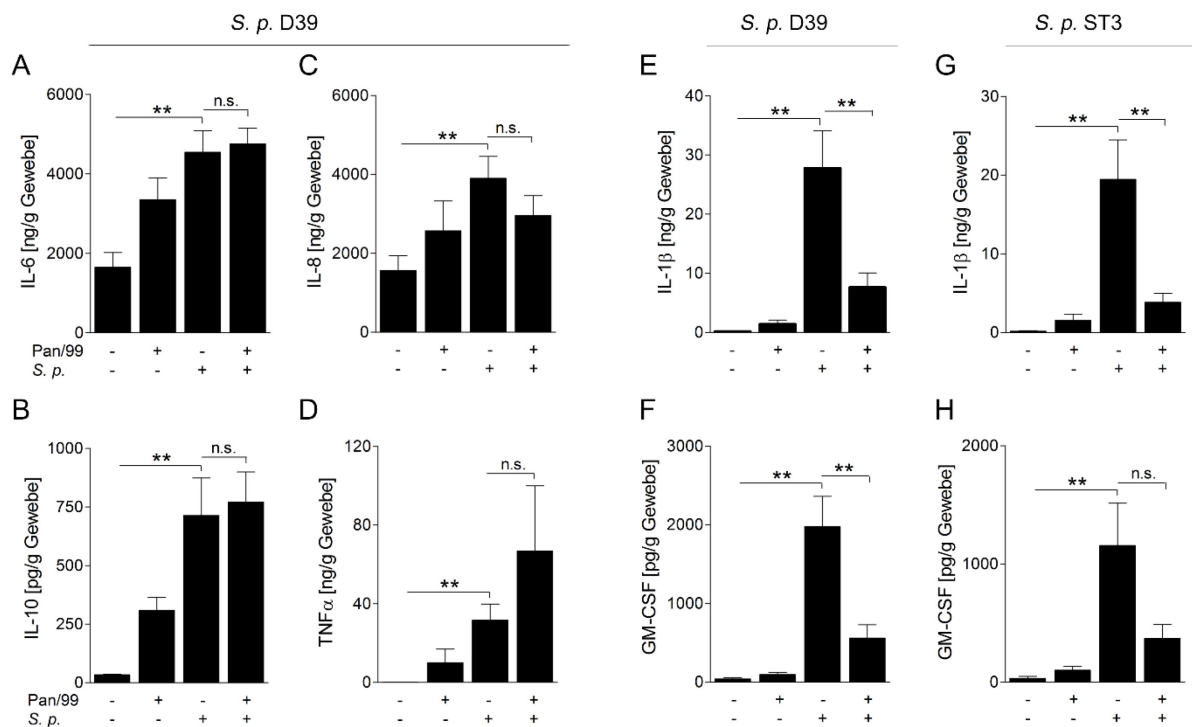


Abbildung 15: Differenzielle Sekretion von Zyto- und Chemokinen koinfizierter Lungenkulturen.

(A-F) Humane Lungenkulturen wurden entweder ausschließlich mit Kulturmedium behandelt, einzeln für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) bzw. mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) oder subsequent mit beiden Erregern (24 h Pan/99(H3N2) + 16 h *S. pneumoniae* D39) infiziert. Den mit nur einem Erreger behandelten Kontrollgruppen wurde zu den entsprechenden Zeiten Kulturmedium anstelle des jeweils zweiten Erregers injiziert. (G, H) Zusätzlich wurden weitere Proben entsprechend des beschriebenen Schemas unter Verwendung eines klinischen *S. pneumoniae* Isolates vom Serotyp 3 (ST3) anstelle von *S. pneumoniae* D39 infiziert. Nach Beendigung der Infektion wurde in den Kulturüberständen die Menge an (A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10, (D) TNF α , (E; G) IL-1 β und (F, H) GM-CSF mittels (B, D – H) Bioplex und (A, C) ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je sechs verschiedenen Patientenproben. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).

Es zeigte sich, dass *S. pneumoniae* D39, unabhängig von einer vorangegangenen Infektion mit Pan/99(H3N2), zur Induktion von IL-6 (Abb. 15A), IL-10 (Abb. 15B), IL-8 (Abb. 15C) und TNF α (Abb. 15D) führte. Pan/99(H3N2) verursachte eine ähnlich starke Freisetzung von IL-6 (Abb. 15A) und IL-8 (Abb. 15C) wie die Pneumokokken, wohingegen IL-10 (Abb. 15B) und TNF α (Abb. 15D) nur geringfügig durch Pan/99(H3N2) induziert wurden. Auch in der nichtinfizierten Kontrolle waren bereits größere Mengen an IL-6 und IL-8 zu detektieren (Abb. 15A und 15C). Im Gegensatz dazu wurde die *S. pneumoniae* D39 induzierte Sekretion von IL-1 β (Abb. 15E) und GM-CSF (Abb. 15F) durch eine primäre Pan/99(H3N2) Infektion deutlich verringert. Verglichen mit der nichtinfizierten Kontrolle induzierte Pan/99(H3N2) beide Zytokine nur unwesentlich. Um zu überprüfen, ob der IAV induzierte Effekt auf IL-1 β und GM-CSF pathophysiologisch relevant ist, wurde anstelle von *S. pneumoniae* D39 ein klinisches *S. pneumoniae* Isolat vom ST3 (10^6 cfu/ml) verwendet. Auch *S. pneumoniae* ST3 induzierte die Freisetzung von IL-1 β (Abb. 15G) und GM-CSF (Abb. 15H), verglichen mit D39 war die induzierte Sekretion jedoch geringer. Gleichwohl inhibierte auch hier eine vorhergehende IAV Infektion die *S. pneumoniae* ST3 ausgelöste Freisetzung beider Zytokine.

3.3 Typ I und II Interferone wirken inhibierend auf die Freisetzung von IL-1 β und GM-CSF

Während einer primären, nicht tödlich verlaufenden IAV Infektion induzierte Typ I und II Interferone führten in Mäusen zu Veränderungen in der Immunantwort des Wirtes gegenüber verschiedenen bakteriellen Erregern (Sun, 2008; Shahangian, 2009; Li, W, 2012). Die Rolle der Interferone für die angeborene Immunantwort in koinfizierten humanen Lungen ist jedoch unklar. Ausgehend von *in vitro* Studien, in denen Interferone die Induktion von IL-1 β (Aman, 1994) und GM-CSF (Aman, 1994; Crane, 2001) beeinflussten, wurde zunächst untersucht ob die Stimulation humanen Lungengewebes mit Typ I und II Interferonen die IAV verursachte Reduktion der pneumokokkeninduzierten Bildung von IL-1 β und GM-CSF bewirkt. Neben dem bisher verwendeten Versuchssatz, bestehend aus Kontrolle, Einzel- und Koinfektionen mit Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39, wurden weitere Lungenstücken für 16 h mit IFN β oder IFN γ bzw. mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ , \pm nachfolgender 16 stündiger *S. pneumoniae* D39 Infektion, stimuliert. Der ursprüngliche Versuchsaufbau (Tabelle 19) erweiterte sich damit um sechs Proben (Tabelle 27).

Tabelle 27: Erweiterter Versuchsaufbau zur Koinfektion von Lungenproben unter Verwendung von IFN β und IFN γ .

Nr.	Probe	Infektionsmuster	Abkürzung
1	nichtinfizierte Kontrolle	24 h Kulturmedium / 16 h Kulturmedium	Kontrolle
2	Pan/99(H3N2) Einfachinfektion	24 h Pan/99(H3N2) / 16 h Kulturmedium	Pan/99(H3N2)
3	<i>S. pneumoniae</i> D39 (bzw. ST3) Einzelinfektion	24 h Kulturmedium/ 16 h <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i> D39 (bzw. ST3)
4	Koinfektion Pan/99(H3N2)/ <i>S. pneumoniae</i>	24 h Pan/99(H3N2) / 16 h <i>S. pneumoniae</i>	Ko-Infektion
5	Interferon β Einfachstimulation	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN β / 16 h Kulturmedium	IFN β
6	Interferon β / <i>S. pneumoniae</i> D39 Infektion	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN γ / 16 h <i>S. pneumoniae</i> D39	IFN β / <i>S. pneumoniae</i> D39
7	Interferon γ Einfachstimulation	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN γ / 16 h Kulturmedium	IFN γ
8	Interferon γ / <i>S. pneumoniae</i> D39 Infektion	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN γ / 16 h <i>S. pneumoniae</i> D39	IFN γ / <i>S. pneumoniae</i> D39
9	Interferon β + Interferon γ kombinierte Stimulation	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN β + IFN γ / 16 h Kulturmedium	IFN β + IFN γ
10	Interferon β + Interferon γ / <i>S. pneumoniae</i> D39 Infektion	8 h Kulturmedium/ 16 h IFN β + IFN γ / 16 h <i>S. pneumoniae</i> D39	IFN β + IFN γ / <i>S. pneumoniae</i> D39

Verglichen mit den Einzelstimulationen von IFN β oder IFN γ (Anhang 1A und 1B) führte die kombinierte Applikation beider Interferone zu einer stärkeren Reduktion der IL-1 β - und GM-CSF Freisetzung, was auf einen synergistischen Effekt beider IFN Typen in der humanen Lunge deutet (Abb. 16A und 16B). Darauf basierend wurde für alle weiteren Versuche die Kombination aus IFN β + IFN γ verwendet. Wie bereits die primäre Infektion mit Pan/99(H3N2) führte auch die Applikation von IFN β + IFN γ nicht zur Unterdrückung der *S. pneumoniae* D39 induzierten Freisetzung von TNF α (Abb. 16C). Entsprechend der Koinfektion mit Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39, führte die vorangegangene Stimulation der Lungenkulturen mit der Kombination aus IFN β + IFN γ im Vergleich zur nichtinfizierten

Kontrolle weder zu einer verstärkten Freisetzung von LDH (Anhang 2A) noch veränderte sie die pneumokokkeninduzierte Sekretion von TNF α in diesen Proben (Anhang 2B).

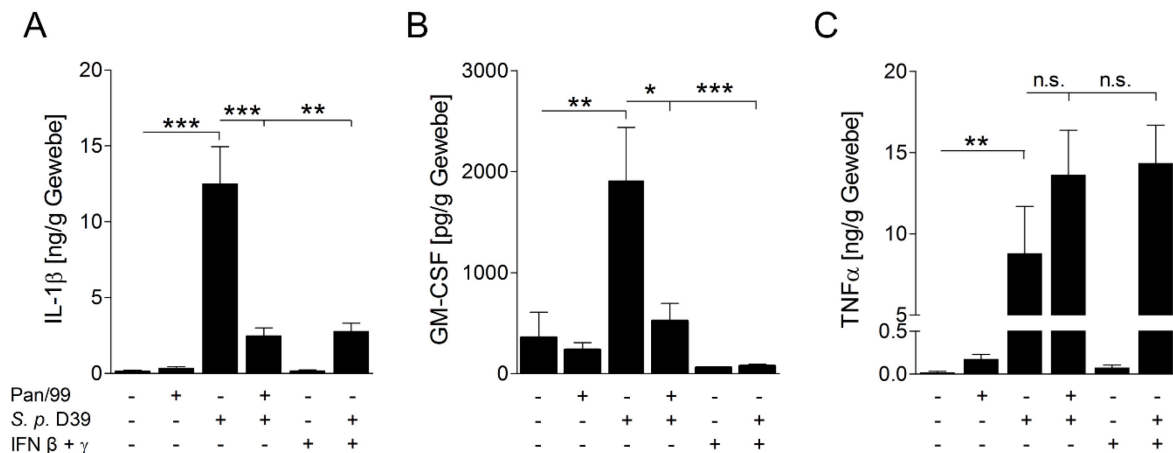


Abbildung 16: Einfluss von Interferon auf die *S. pneumoniae* bedingte Zytokinsekretion.

Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und darauffolgend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert worden. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten, den einzeln infizierten Proben anstelle des jeweils zweiten Erregers Kulturmedium injiziert. Zusätzlich wurden Lungenkulturen für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) bzw. PBS stimuliert und anschließend mit Kulturmedium bzw. *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Die Quantifizierung der Sekretion an (A) IL-1 β , (B) GM-CSF und (C) TNF α erfolgte in den Kulturüberständen mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus (A; B) sieben bzw. (C) sechs verschiedenen Patientenproben. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, Mann-Whitney-Test).

3.4 IL-1 β regulierte Freisetzung von GM-CSF in humanen Lungenkulturen

Die Vorstimulation mit IFN β + IFN γ führte in den Lungenkulturen zur Suppression der *S. pneumoniae* induzierten Bildung von IL-1 β (Abb. 16A) und GM-CSF (Abb. 16B). Ob die Interferone dabei direkt auf die Freisetzung der beiden Zytokine wirken bzw. diese sich untereinander regulativ beeinflussen blieb ungewiss. In einer von Carkarova *et al.* publizierten Studie wurde die Bildung von alveolärem, epithelial gebildetem GM-CSF in Mäusen durch TNF α verursacht. (Carkarova, 2009). Da die *S. pneumoniae* induzierten Level an TNF α in den Lungenproben unverändert durch die vorhergehende IAV Infektion bzw. Stimulation mit IFN β + IFN γ blieben (Abb. 16C), resultierte anlehnend an diesen Befund die Vermutung, dass die Bildung von GM-CSF im humanen Lungengewebe abhängig von IL-1 β reguliert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Lungenkulturen 4 h mit dem IL-1 Rezeptorantagonisten Anakinra (1 μ g/ml) vorstimuliert und anschließend für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert oder mit IL-1 β (10 ng/ml) behandelt. Die Quantifizierung von GM-CSF in den Kulturüberständen zeigte, dass die von *S. pneumoniae* D39 ausgelöste GM-CSF

Sekretion durch den IL-1 Rezeptorantagonisten signifikant reduziert wurde (Abb. 17A). Damit übereinstimmend führte die Stimulation der Lungenstücken mit IL-1 β zu einer Freisetzung von GM-CSF, welche mit der *S. pneumoniae* D39 induzierten vergleichbar war und ebenfalls vollständig durch Anakinra blockiert werden konnte (Abb. 17A). Im Gegensatz dazu bewirkte die Stimulation der Lungenkulturen mit TNF α eine sehr schwache Induktion von GM-CSF (Abb. 17B). Darüber hinaus wurde die geringe Menge an freigesetztem GM-CSF durch die vorherige Blockade des IL-1 Rezeptors mit Anakinra vollständig unterdrückt, was darauf hindeutet, dass die leichte Induktion mit hoher Wahrscheinlichkeit abhängig von IL-1 β erfolgte (Abb. 17B). Die Überprüfung der pathophysiologischen Aktivität von TNF α anhand der Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den Proteinlysaten der gleichen Lungenproben im Western Blot zeigte, dass die Stimulation mit TNF α zur effektiven Bildung der COX-2 führte (Anhang 3).

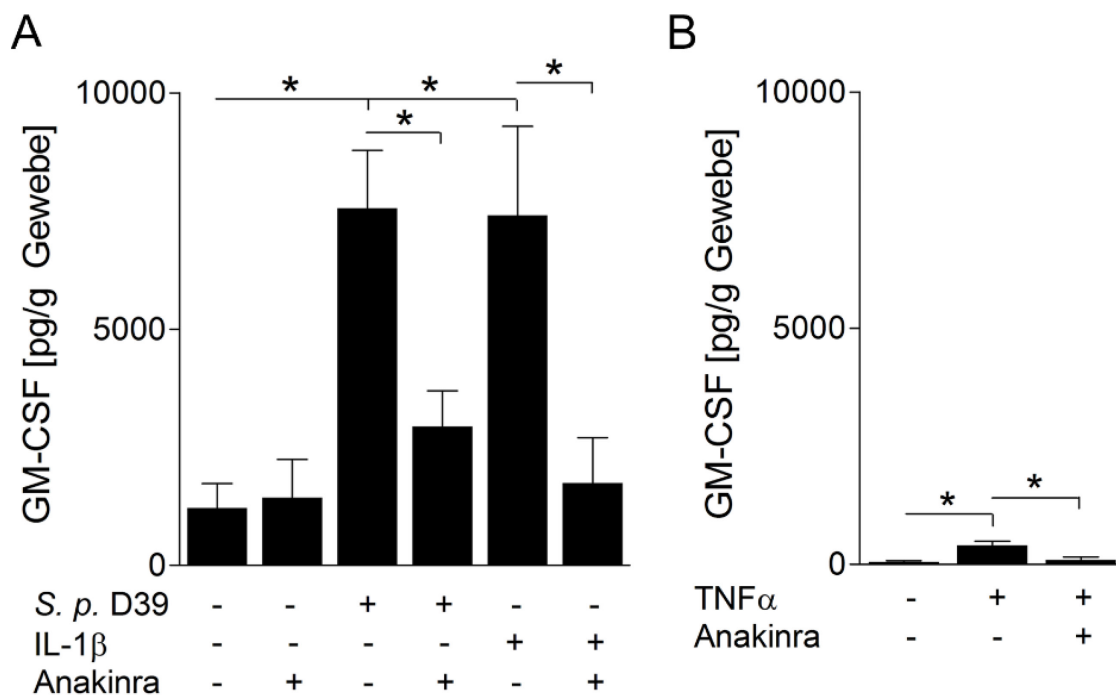


Abbildung 17: IL-1 β reguliert die GM-CSF Freisetzung in humanen Lungenkulturen.

(A) Lungenkulturen wurden für 4 h mit PBS bzw. Anakinra (1 μ g/ml) vorstimuliert, bevor ihnen für weitere 16 h entweder PBS enthaltendes Kulturmedium, *S. pneumoniae* D39 (10⁶ cfu/ml) oder IL-1 β (10 ng/ml) injiziert wurde. (B) Lungenkulturen wurden für 4 h mit PBS bzw. Anakinra (1 μ g/ml) inkubiert und anschließend für weitere 16 h mit TNF α (100 μ g/ml) stimuliert. Die Quantifizierung der GM-CSF Sekretion erfolgte in den Kulturüberständen mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je vier verschiedenen Patientenproben. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, Mann-Whitney-Test).

Unterliegt die bakteriell induzierte Bildung von GM-CSF einer IL-1 β abhängigen Regulation, muss die *S. pneumoniae* D39 bedingte Sekretion von IL-1 β chronologisch vor der von GM-CSF erfolgen. Um die Kinetik der pneumokokkeninduzierten Bildung von IL-1 β und GM-CSF zu untersuchen, wurden Lungenproben mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert und der Gehalt an IL-1 β und GM-CSF in den zu festgelegten Zeitpunkten (2, 4, 6, 8 und 16 h) entnommenen Kulturüberständen quantifiziert. Im direkten Vergleich der Expressionsmuster beider Zytokine bestätigte sich, dass IL-1 β bereits 4 - 6 h nach Infektionsbeginn sekretiert wurden, wo hingegen die Freisetzung von GM-CSF erst nach 8 - 16 h detektiert werden konnte (Abb. 18).

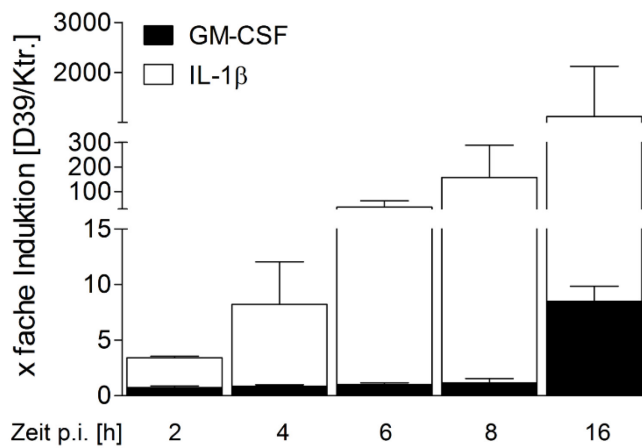


Abbildung 18: Die *S. pneumoniae* induzierte Expressionskinetik von IL-1 β und GM-CSF erfolgt zeitlich versetzt.

In den Kulturüberständen von mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infizierten Lungenkulturen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Infektion die Sekretion von IL-1 β und GM-CSF mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Interferon blockiert Synthese von IL-1 β auf Transkriptionsebene

3.5.1 Pan/99(H3N2) verhindert Bildung *S. pneumoniae* induzierten pro-IL-1 β

Die Bildung von IL-1 β wird über einen zwei Signale umfassenden Mechanismus reguliert, in welchem das erste Signal (u.a. durch Aktivierung von TLRs) zur Bildung von pro-IL-1 β führt. Das zweite Signal (z. B. bakterielle RNA, ROS, extrazelluläres ATP) bewirkt die Aktivierung des NALP3 Inflammasoms, welches über die proteolytische Spaltung die funktionelle Form der Caspase-1 generiert. Diese spaltet wiederum pro-IL-1 β in aktives IL-1 β (Thornberry, 1992).

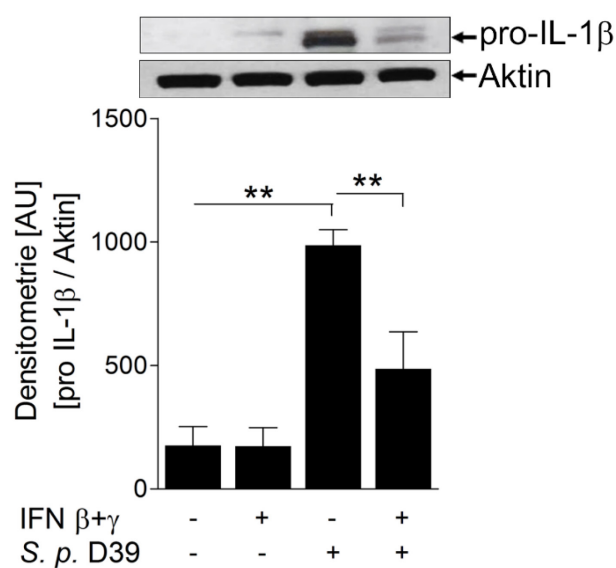


Abbildung 19: Interferon hemmt Bildung der *S. pneumoniae* induzierten Bildung von pro-IL-1 β im Western Blot.

Lungenkulturen wurden mit PBS haltigem Kulturmedium oder einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) stimuliert und nach 16 h mit *S. pneumoniae* D39 bzw. Kulturmedium infiziert. 16 h nach Beginn der Pneumokkeninfektion erfolgte die Entnahme der Lungenkulturen. Das Gewebelysat wurde im Western Blot auf die Bildung von pro-IL-1 β untersucht, anschließend wurden die densitometrisch quantifizierten Mengen an pro-IL-1 β im Verhältnis zu Aktin ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs unabhängigen Experimenten (* p <0,05, ** p <0,01, Mann-Whitney-Test).

Um festzustellen an welcher Stelle die interferoninduzierte Blockade der IL-1 β Produktion erfolgt, wurden Proteinlysate koinfizierter Lungenproben semiquantitativ im Western Blot auf die Expression von pro-IL-1 β untersucht. Auch hier zeigte sich die interferonbedingte Suppression der *S. pneumoniae* D39 ausgelösten Bildung von pro-IL-1 β . Die durch die Pneumokokkeninfektion induzierte pro-IL-1 β Bande bei etwa 31 kDa war in den koinfizierten Proben deutlich schwächer als in den nur mit *S. pneumoniae* D39 infizierten Proben (Abb. 19). In der densitometrischen Quantifizierung der Blots zeigte sich, dass die *S. pneumoniae* D39 ausgelöste Bildung von pro-IL-1 β durchschnittlich um etwa 50 % durch die vorhergehende Infektion mit Pan/99(H3N2) verringert wurde.

3.5.2 Interferon unterdrückt Transkription von pro-IL-1 β mRNA

Basierend auf der beobachteten Reduktion von pro-IL-1 β auf Proteinebene im Western Blot, resultierte die Annahme einer interferonbedingten Blockade der Bildung von IL-1 β auf

Transkriptionsebene. Erneut wurden Lungenstücken 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) vorstimuliert und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. In der aus den Lungengewebe isolierten RNA wurde die Expression verschiedener mRNAs mittels qPCR quantifiziert. Wie auch auf Translationsebene (Abb. 19), kam es durch die vorherige Stimulation mit IFN β + IFN γ zu einem Abfall der *S. pneumoniae* D39 induzierten Expression der pro-IL-1 β mRNA (Abb. 20A).

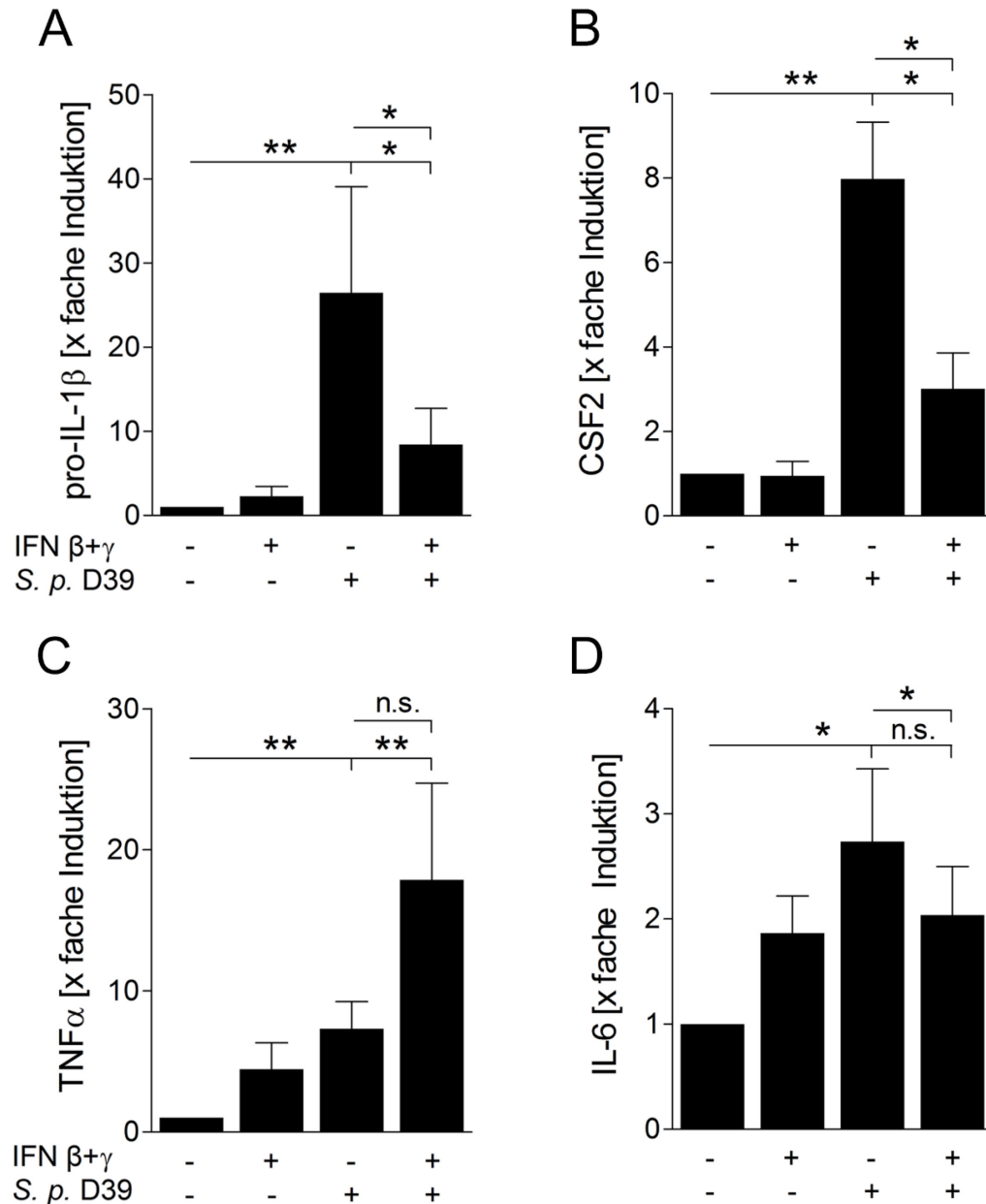


Abbildung 20: Einfluss der Interferone auf die Transkription *S. pneumoniae* induzierter Zytokine.

Unter Verwendung eines kommerziellen Kits wurde RNA aus Gewebeproben isoliert, welche entweder für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) bzw. PBS stimuliert waren und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 oder Kulturmedium infiziert wurden. Über die in cDNA umgeschriebene RNA erfolgte die Quantifizierung der mRNA Expression von (A) IL-1 β , (B) GM-CSF, (C) TNF α und (D) IL-6 mit Hilfe von TaqMan Sonden in der qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus acht unabhängigen Experimenten (* p <0,05, ** p <0,01, Mann-Whitney-Test).

Der hohe *SEM* resultierte aus der unterschiedlich starken Induktion der pro-IL-1 β mRNA Expression, in sieben von acht quantifizierten Probensätzen kam es zu einer deutlichen Suppression. Ein entsprechendes Expressionsmuster zeigte sich auch für die über das *Colony Stimulating factor 2* (CSF2) Gen gebildete mRNA von GM-CSF (Abb. 20B). Die *S. pneumoniae* D39 bedingte Bildung von TNF α (Abb. 20C) und IL-6 mRNA (Abb. 20D) wurde nicht von der Interferonstimulation beeinflusst.

3.5.3 Interferon wirkt nicht auf die inflammasomregulierte Bildung von IL-18

Neben IL-1 β wird auch die Reifung von IL-18 über das Inflammasom reguliert. Um zu überprüfen, ob dessen Bildung ebenfalls durch eine vorangegangene IAV Infektion bzw. die Wirkung von Interferonen beeinflusst wird, erfolgte die Quantifizierung von IL-18 in den gleichen Kulturüberständen und RNA-Isolaten in denen auch IL-1 β gemessen wurde.

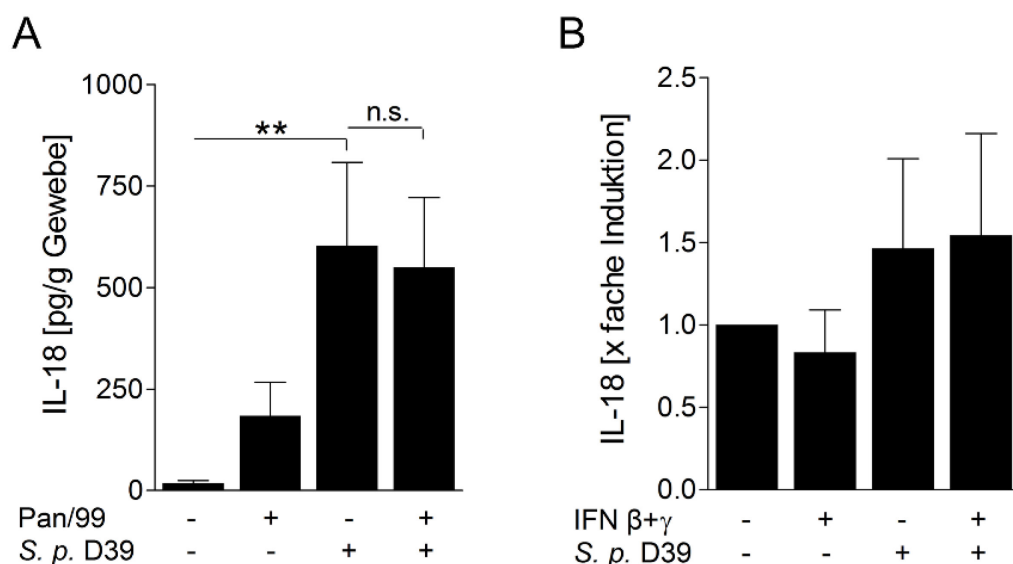


Abbildung 21: Die *S. pneumoniae* induzierte IL-18 Bildung bleibt unbeeinflusst von IAV.

(A) Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und sekundär für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten, den einzeln infizierten Proben anstelle des jeweils zweiten Erregers Kulturmedium injiziert. Die Quantifizierung von IL-18 in den Kulturüberständen erfolgte mittels Bioplex. (B) Lungenkulturen wurden für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder PBS stimuliert und subsequent weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert bzw. entsprechend mit Kulturmedium behandelt. Die Quantifizierung der IL-18-Expression erfolgte mittels TaqMan Sonden in der qPCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus (A) sechs bzw. (B) acht unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Mann-Whitney-Test).

Entsprechend IL-1 β verursachte die Infektion mit *S. pneumoniae* D39 die Sekretion von IL-18 in den Überstand, im Gegensatz dazu blieb diese aber unbeeinflusst von einer primären IAV Infektion (Abb. 21A). Für die Expression der mRNA zeigte sich sowohl in den nur *S.*

pneumoniae D39 infizierten als auch in den mit Pan/99(H3N2) koinfizierten Proben lediglich eine sehr geringe Induktion (Abb. 21B).

3.6 Direkte Suppression der GM-CSF Freisetzung durch Interferon

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Lungenkulturen jeweils mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert bzw. zunächst für 8 h mit IFN β + IFN γ vorstimuliert und anschließend für weitere 16 h mit IL-1 β behandelt. Die Quantifizierung von GM-CSF in den Kulturüberständen zeigte, dass die interferonbedingte Inhibition von GM-CSF nicht ausschließlich über die Suppression von IL-1 β erfolgte, sondern die Interferone auch direkt die Freisetzung von GM-CSF nach Stimulation mit IL-1 β inhibierten (Abb. 22).

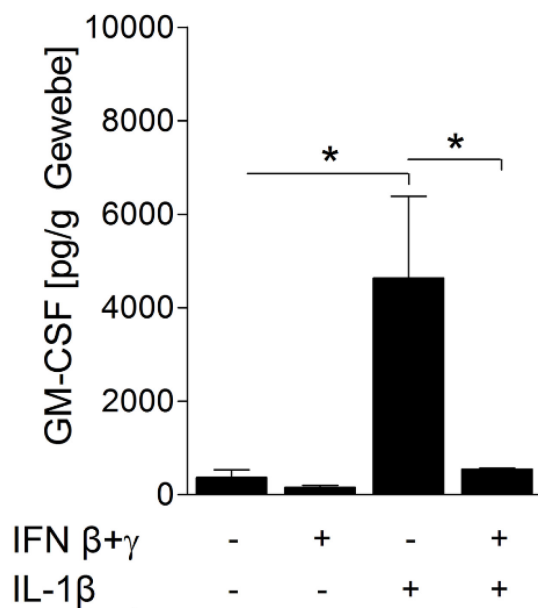


Abbildung 22: Interferon wirkt auch direkt auf die Freisetzung von GM-CSF.

Lungenkulturen wurden für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder PBS stimuliert, anschließend weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) bzw. Kulturmedium infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Zeitpunkten PBS haltiges Kulturmedium injiziert. Die Quantifizierung von GM-CSF erfolgte in den Kulturüberständen im ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$, Mann-Whitney-Test).

3.7 Auswirkung der Koinfektion auf die Bildung der Cyclooxygenase-2

IL-1 β spielt im Immunsystem und damit für die Infektionsabwehr eine zentrale Rolle (Garlanda, 2013), so dass fehlendes IL-1 β neben der veränderten Regulation der GM-CSF Bildung auch andere pathophysiologische Reaktionen beeinflussen würde. Mehrfach in der Literatur beschrieben, trägt IL-1 β zur Induktion der COX-2 Bildung bei (Molina-Holgado, 2000; Tsuzaki, 2003), welche durch verschiedene bakterielle Infektionen aktiviert wird (N'Guessan, 2006; Szymanski, 2012).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde überprüft, ob die veränderte Freisetzung von IL-1 β die Bildung der COX-2 in den mit Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39 koinfizierten Proben beeinflusst. Dazu wurden zunächst Proteinlysate koinfizierter Lungenproben (Infektionsschema Tabelle 19) im Western Blot auf die Bildung der COX-2 getestet. In dem exemplarisch abgebildeten Blot zeigte sich im Einklang mit vorhergehenden Studien der Arbeitsgruppe (Szymanski, 2012), dass die COX-2 durch *S. pneumoniae* D39 induziert wird (Abb. 23A). Die vorhergehende Infektion mit Pan/99(H3N2) verringerte diese Induktion. Die densitometrische Analyse von acht Patientenproben zeigte, dass eine vorangegangene IAV Infektion die pneumokokkeninduzierte COX-2 Expression auf Proteinebene durchschnittlich um etwa 40-50 % verringerte (Abb. 23A). Auch die pneumokokkeninduzierte Transkription der Prostaglandin G/H Synthase 2 (PTGS2), dem Gen welches die COX-2 kodiert, wurde durch die vorherige Stimulation mit IFN β + IFN γ signifikant reduziert (Abb. 23B).

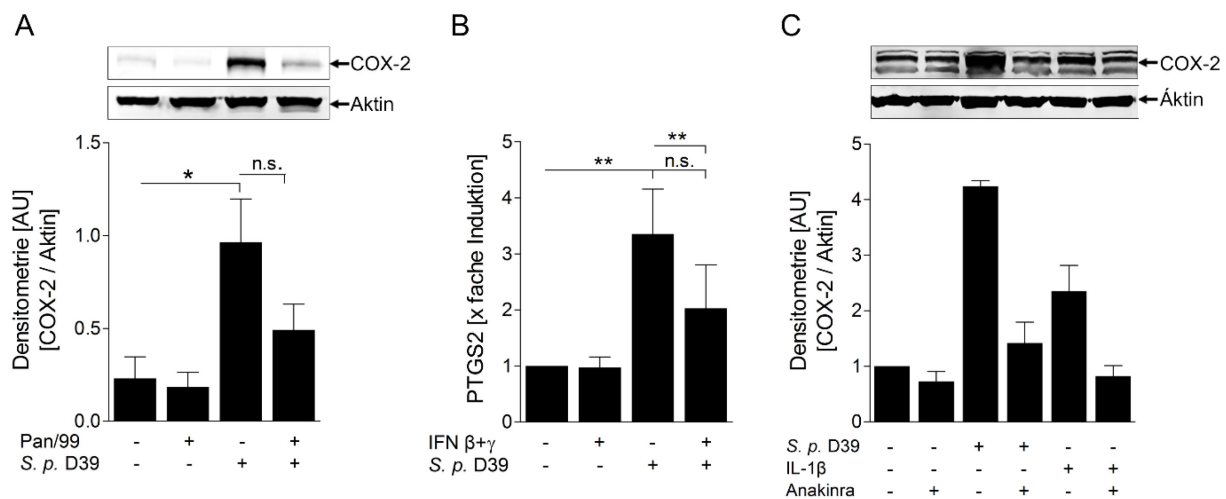


Abbildung 23: Einfluss IAV induzierter Interferone auf die Expression der COX-2 durch die veränderte Sekretion von IL-1 β .

(A) Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten, den einzeln infizierten Proben anstelle des zweiten Erregers zum jeweils entsprechenden Zeitpunkt Kulturmedium injiziert. Das aus dem homogenisierten Gewebe extrahierte proteinhaltige Lysat wurde im Western Blot auf die Bildung der COX-2 und Aktin untersucht. Anschließend wurde die COX-2 densitometrisch quantifiziert und im Verhältnis zu Aktin aufgetragen. (B) Lungenkulturen wurden für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder PBS stimuliert und anschließend weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert, bzw. entsprechend mit Kulturmedium behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der COX-2 mittels einer TaqMan Sonde in der qPCR quantifiziert. (C) Humane Lungenkulturen wurden für 4 h mit PBS bzw. Anakinra (1 μ g/ml) inkubiert, bevor ihnen entweder PBS enthaltendes Kulturmedium, *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) oder IL-1 β (10 ng/ml) injiziert wurde. Die Expression von COX-2 und Aktin wurde im Western Blot ermittelt und densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von (A) fünf, (B) acht bzw. (C) drei unabhängigen Experimenten (* p <0,05, ** p <0,01, Mann-Whitney-Test).

Um zu bestätigen, dass diese Reduktion tatsächlich durch fehlendes IL-1 β bedingt war, wurde im Western Blot die Expression der COX-2 in Lungenproben analysiert, welche vorab \pm dem IL-1 Rezeptorantagonisten behandelt und anschließend mit *S. pneumoniae* D39 infiziert bzw. IL-1 β stimuliert wurden. Es zeigte sich, dass IL-1 β zur Induktion der COX-2 führte, wenn auch geringfügiger als *S. pneumoniae* D39 (Abb. 23C). Eine vorhergehende Behandlung mit Anakinra verhinderte diese Induktion und auch die von den Pneumokokken ausgelöste Bildung der COX-2 wurde durch Blockierung des IL-1 Rezeptors verringert (Abb. 23C).

3.8 Zelluläre Interaktion der interferonvermittelten Blockade der Freisetzung von IL-1 β und GM-CSF

3.8.1 Phänotypische Charakterisierung isolierter primärer AM und AECII

Die in den Lungengeweben generierten Daten weisen darauf hin, dass die IAV induzierten Typ I und II Interferone über die Blockade der IL-1 β Freisetzung zum Verlust von GM-CSF führen. Um zu verstehen, welches interzelluläre Zusammenspiel den beobachteten Effekten im humanen Lungengewebe während den Infektionen mit Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39 zugrunde liegt, wurden primäre AM und AECII aus den Geweben isoliert. Für IAV wurde bereits gezeigt, dass sie primär AECII infizieren und in diesen replizieren (Weinheimer, 2012) und auch für *S. pneumoniae* konnte bereits eine inflammatorische Aktivierung des respiratorischen Epithels nachgewiesen werden (Szymanski, 2012). Zudem spielen residente AM, aufgrund ihrer exponierten Position als „*first line of defence*“ der angeborenen Immunität sowie durch die Kommunikation mit dem alveolären Epithel eine zentrale Rolle bei der Abwehr mikrobieller Infektionen (Wang, J, 2008, Westphalen, 2014).

Beide Zelltypen wurden nach ihrer Isolation zunächst phänotypisch mittels Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Neben der für sie typischen kugeligen Morphologie, ergab sich für die AM eine positive Färbung mit dem Oberflächenmarker CD68 (roter Kanal) (Abb. 24A). Die AECII waren positiv für den Typ II Zellmarker pro-SP-C (grüner Kanal) und für den Epithelzellmarker pan-Cytokeratin (roter Kanal) (Abb. 24B). Beide Zelltypen zeigten eine intakte Kernmorphologie (DAPI, blauer Kanal). Da AECII sich *in vivo* zu AECl differenzieren können (*in vitro* zu AECl-ähnlich transdifferenzieren), wurden die Zellen zunächst für fünf Tage kultiviert. Alle 24 h wurden Zellen für die Phänotypisierung fixiert und gegen pro-SP-C als Marker für AECII und Caveolin-1 als Marker für AECl gefärbt. Exemplarisch sind nur die nach 72 und 120 h fixierten Zellen abgebildet (Abb. 24C und 24D). Während das detektierte pro-SP-C Signal (grüner Kanal, Abb. 24C) in den Zellen im Zeiterlauf

täglich geringer wurde und nach 120 h Kultivierung kaum noch zu detektieren war, stellte sich das Caveolin-1 Signal (grüner Kanal, Abb. 24D) zunächst schwach dar und nahm nach 120 h Kultivierung rapide zu. Um die Konfluenz der Zellpopulationen zu den jeweiligen Zeitpunkten zu überprüfen, wurde zur Darstellung des Zytoskeletts F-Aktin mittels Phalloidin angefärbt (roter Kanal, Abb. 24C und 24D). Neben der veränderten Bildung von Zellmarkern ging mit der Transdifferenzierung der AECII in AECI-ähnlich auch eine morphologische Veränderung der für die AECII charakteristischen kubischen Form zu der für die AECI typischen großflächigen, flachen Form einher. Um eine einheitliche AECII Kultur zu gewährleisten, mussten die isolierten Zellen innerhalb von zwei bis vier Tagen nach der Isolation verwendet werden. Zusätzlich wurden die AECII gegen den AM Marker CD68 gefärbt, um Verunreinigung mit den entsprechenden Zellpopulationen bewerten zu können.

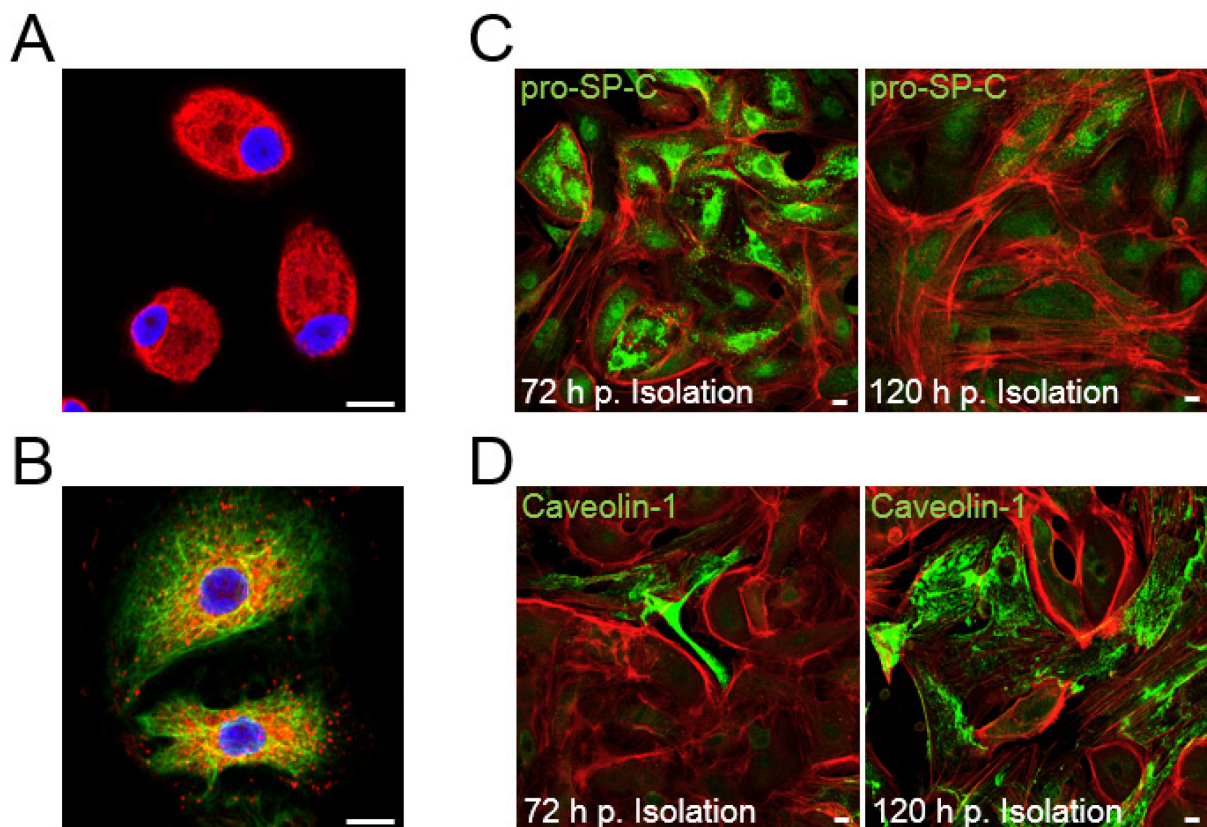


Abbildung 24: Phänotypisierung isolierter AM und AECII mittels Immunfluoreszenz.

AM und AECII wurden aus humanem Lungengewebe isoliert und durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Konfokalmikroskopie unter Verwendung spezifischer Zellmarker phänotypisiert. (A) Zwei Tage kultivierte AM waren positiv für CD68 (roter Kanal). (B) Vier Tage kultivierte AECII waren positiv für pro-SP-C (grüner Kanal) und pan-Cytokeratin (roter Kanal). (A, B) Die Kernmorphologie wurde durch eine DAPI Färbung visualisiert. (C; D) Auf Glasplättchen kultivierte AECII wurden 72 bzw. 120 h nach Isolation fixiert und auf die Expression von (C) pro-SP-C (grüner Kanal, weiße Pfeilspitzen) und (D) Caveolin-1 (grüner Kanal, weiße Pfeile) getestet. (C, D) Zur Darstellung des Zytoskeletts wurde F-Aktin mittels Phalloidin gefärbt (roter Kanal). Maßstab: 10 µm.

Der Anteil an AM betrug etwa 3-5 %, Endothelzellen wurden aufgrund der weniger starken enzymatischen Bedingungen während des Gewebeaufschlusses überwiegend gar nicht isoliert. Stark fibrotische Lungenpräparate wiesen sporadisch Kontaminationen mit Fibroblasten auf, die isolierten Zellen wurden nicht für die Versuchsdurchführung verwendet.

3.8.2 Pan/99(H3N2) induziert Typ I, II und III Interferonsekretion in AECII

Um festzustellen, ob in einem der beiden Zelltypen die in den Lungenkulturen detektierte IAV induzierte Interferonbildung erfolgte, wurden sowohl AM als auch AECII für 24 h mit Pan/99(H3N2) (MOI 1) infiziert. Nur in den mit IAV infizierten AECII Kulturüberständen konnten IFN α (Abb. 25A), IFN β (Abb. 25B), IFN γ (Abb. 25C) und IFN λ_1 (Abb. 25D) detektiert werden. Verglichen mit den anderen gemessenen Interferonen wurden aus den AECII, wie bereits in den Lungenkulturen, verhältnismäßig große Mengen an IFN γ durch die IAV Infektion freigesetzt (Abb. 25C).

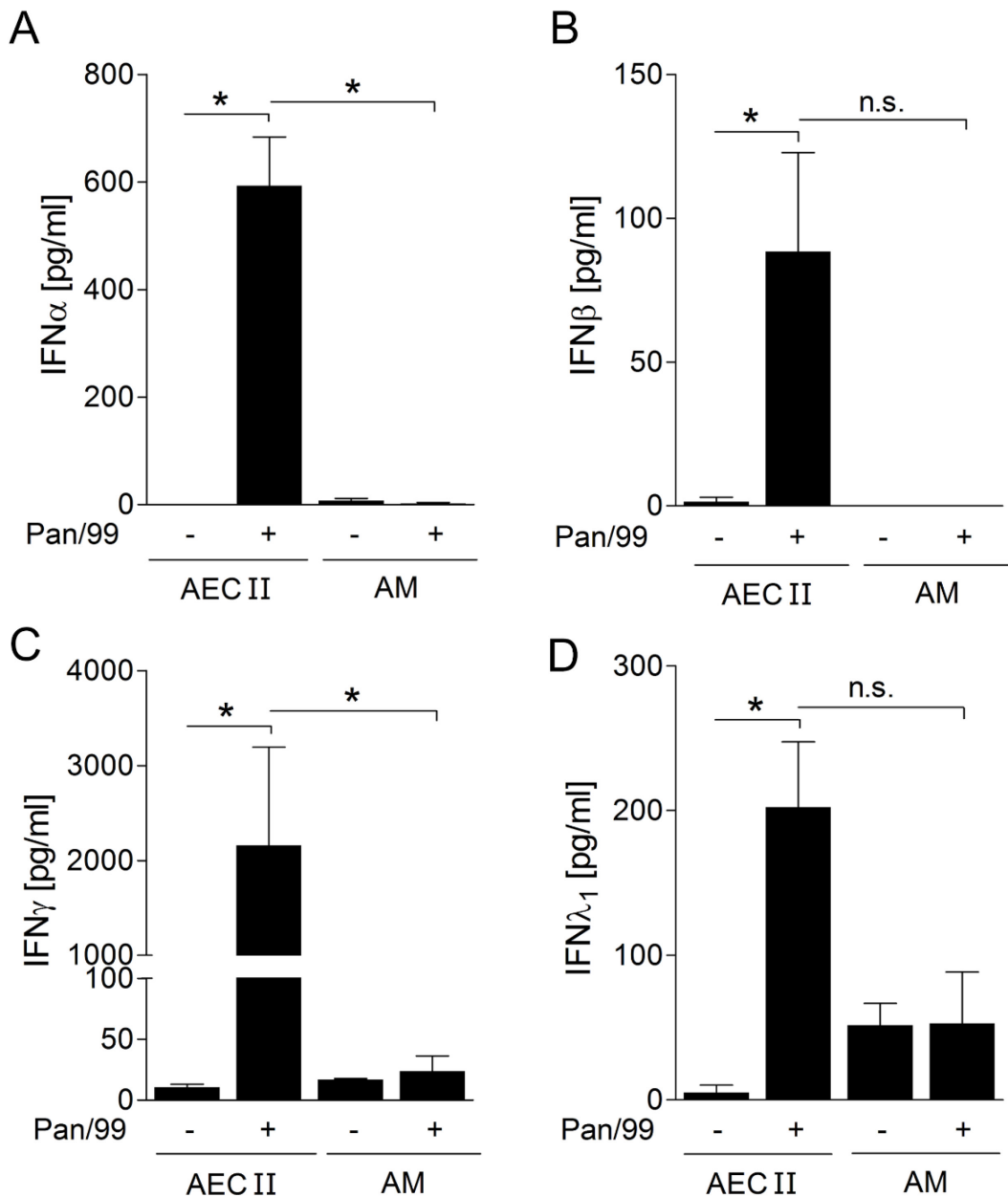


Abbildung 25: IAV induziert die Sekretion von Typ I, II und III Interferonen aus primären humanen AECII.

Primäre humane AECII und AM wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (MOI 1) infiziert. Nach Beendigung der Infektion wurde die Menge an gebildetem (A) IFNα, (B) IFNβ, (C) IFNγ und (D) IFNλ₁ (D) in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier verschiedenen Patientenproben. (* $p < 0,05$, Mann-Whitney-Test).

3.8.3 AECII sezernieren GM-CSF über von AM gebildetes IL-1β

Beide Zelltypen wurden für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) infiziert und die in den Kulturüberstand freigesetzte Menge an IL-1β bestimmt. In den AECII konnte kein IL-1β detektiert werden (Abb. 26A), ausschließlich die pneumokokkeninfizierten AM sezernierten IL-1β (Abb. 26C). Keine der beiden mit *S. pneumoniae* D39 infizierten Zelltypen sekretierte

GM-CSF (Abb. 26B und 26D). Basierend auf der Beobachtung der IL-1 β induzierten Freisetzung von GM-CSF im Lungengewebe wurden AECII direkt für 16 h mit rekombinantem IL-1 β (5 ng/ml) stimuliert, was zur Sekretion von GM-CSF führte (Abb. 26D).

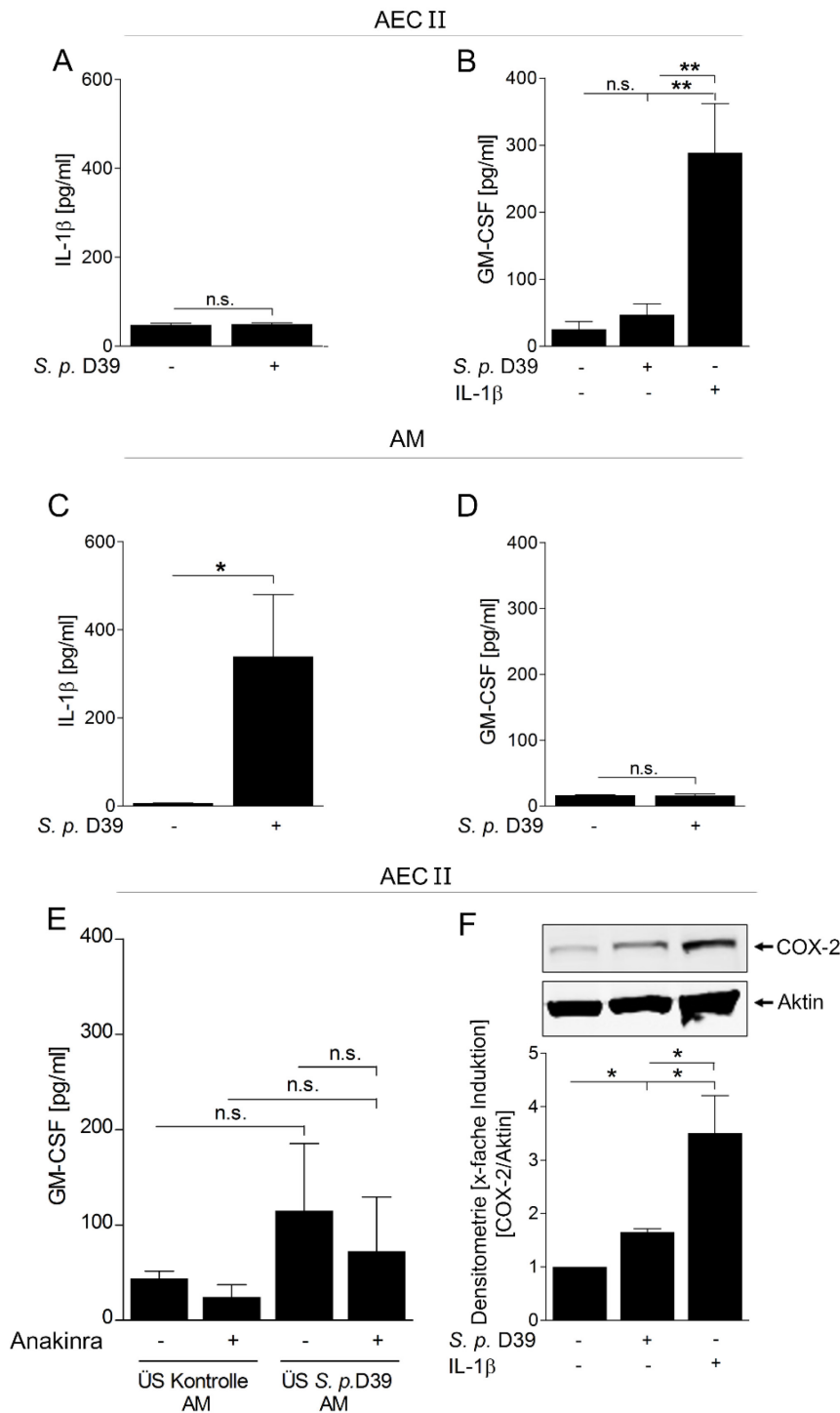


Abbildung 26: Die pneumokokkenbedingte Freisetzung von IL-1 β aus AM reguliert die Bildung von GM-CSF und COX-2 aus AECII.

Primäre humane AECII und AM wurden für 16 h mit (A-D; F) *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) infiziert bzw. mit (B; F) IL-1 β (5 ng/ml) (B; F). Mittels ELISA wurde die Menge an gebildetem (A; C) IL-1 β bzw. (B; D) GM-CSF in den Überständen bestimmt. (E) AM wurden für 20 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 1) infiziert, der zentrifugierte Kulturüberstand wurde für 16 h auf AECII transferiert, die zuvor für 4 h \pm Anakinra (1 μ g/ml) behandelt worden sind. Anschließend wurde die Menge an gebildetem GM-CSF im ELISA quantifiziert. (F) AECII wurden für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI: 0,5) bzw. IL-1 β (5 ng/ml) inkubiert. Die Lysate wurden im Western Blot auf die Expression der COX-2 und Aktin überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (A-E) aus mindestens je drei verschiedenen Patientenproben. (* p <0,05; ** p <0,01; Mann-Whitney-Test).

IL-1 β erwies sich, sowohl in den Gewebekulturen als auch in den primären AECII als voraussetzend für die Bildung von GM-CSF. Um Mengen an IL-1 β für die Stimulation der

AECII einzusetzen, welche pathophysiologisch mit den während einer Pneumokokkeninfektion gebildeten übereinstimmen, wurden AM für 20 h mit *S. pneumoniae* D39 infiziert. Der so generierte Kulturüberstand wurde anschließend für 16 h auf isolierte AECII transferiert, welche vorab 4 h \pm Anakinra (1 μ g/ml) inkubiert worden sind. Die GM-CSF Messung in den AECII Kulturüberständen zeigte, dass AECII, welche mit dem Überstand von *S. pneumoniae* D39 infizierten AM inkubiert wurden, GM-CSF produzierten. Die Freisetzung von GM-CSF konnte geringfügig durch eine vorherige Behandlung der AECII mit Anakinra reduziert werden (Abb. 26E). Entsprechend der Sekretion von GM-CSF aus AECII zeigte die densitometrische Quantifizierung der im Western Blot untersuchten COX-2 Expression, dass diese lediglich schwach durch *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5; 16 h), deutlich stärker jedoch durch die Stimulation mit IL-1 β (5 ng/ml; 16 h) induziert wurde (Abb. 26F).

3.8.4 Interferonvermittelte Suppression der IL-1 β Bildung in primären AM

In den Lungenkulturen unterdrückte die Infektion mit IAV interferonabhängig die *S. pneumoniae* vermittelte Freisetzung von IL-1 β . Auch die mit *S. pneumoniae* D39 stimulierten AM sezernierten IL-1 β (Abb. 26C), was zu der Annahme führte, dass dessen Freisetzung ebenfalls interferonabhängig unterdrückt werden könnte. Da keine effiziente Infektion von AM mit Pan/99(H3N2) möglich war bzw. keine Freisetzung von Interferonen erfolgte (Abb. 25A-D), wurden AM direkt für 16 h mit IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) vorstimuliert, bevor sie für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI: 0,5) infiziert wurden.

Wie im humanen Lungengewebe führte die Vorbehandlung mit Interferonen zum Ausbleiben der IL-1 β Freisetzung in den mit Pneumokokken infizierten AM (Abb. 27A). Die in den gleichen Kulturüberständen ermittelte Ausschüttung von TNF α zeigte, dass auch in den AM die TNF α Sekretion nicht interferonabhängig beeinflusst wurde (Abb. 27B). Der Befund für die IAV abhängige Reduktion von pro-IL-1 β in den Gewebelysaten der Lungenkulturen, spiegelte sich, wenn auch weniger stark ausgeprägt, in den Proteinlysaten der mit IFN β + IFN γ und *S. pneumoniae* D39 behandelten AM wider (Abb. 27C).

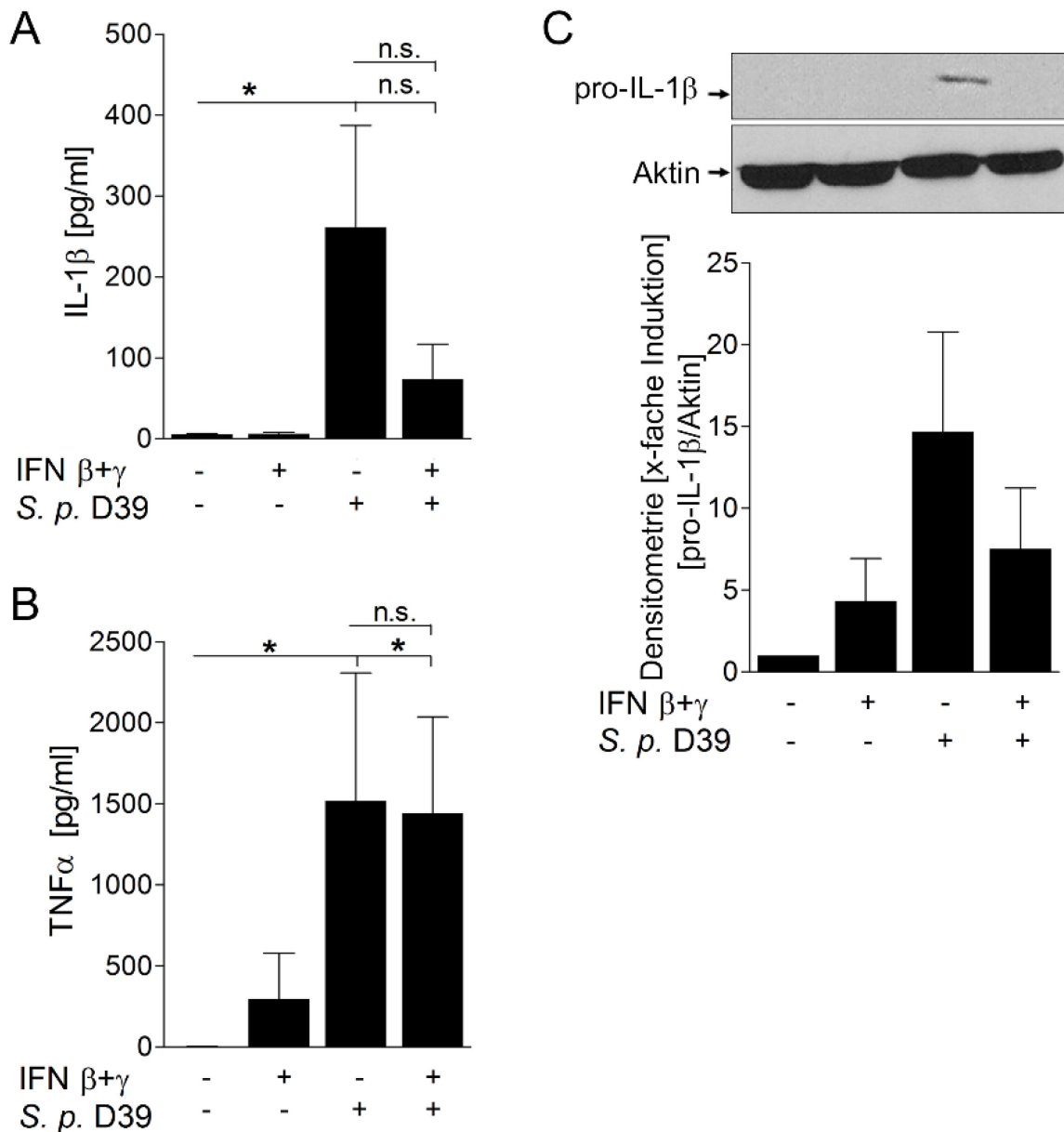


Abbildung 27: Interferon unterdrückt die *S. pneumoniae* induzierte Freisetzung von IL-1 β aus AM.

Humane AM wurden für 16 h mit einer Kombination von IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder PBS haltigem Kulturmedium stimuliert und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) infiziert, bzw. entsprechend mit Kulturmedium behandelt. In den Kulturüberständen wurde die Menge an gebildetem (A) IL-1 β (A) bzw. (B) TNF α mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von pro-IL-1 β und Aktin in den Zelllysaten der AM im Western Blot bestimmt und densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je drei verschiedenen Patientenproben. (* p <0,05; Mann-Whitney-Test).

3.8.5 IL-1 β vermittelte Freisetzung von Zytokinen aus AECI-ähnlich

Verglichen mit den in den Lungenkulturen detektierten Mengen an GM-CSF erwiesen sich die in den AECII gemessenen Werte als relativ gering. Daraus resultierte die Überlegung, ob auch AECI zur Produktion von GM-CSF befähigt sind.

AECII wurden für mindestens zehn Tage kultiviert um sie zu AECI-ähnlich zu transdifferenzieren. Anschließend wurden sie für 16 h sowohl mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) infiziert als auch direkt mit IL-1 β (5 ng/ml) stimuliert. Wie bereits bei den AECII bewirkte die Infektion mit *S. pneumoniae* D39 keine Freisetzung von GM-CSF. Nach der direkten Applikation von IL-1 β konnte GM-CSF in den Kulturüberständen der AECI-ähnlich gemessen werden, ähnlich der in den AECII gemessenen Werte (Abb. 28A). Um zu überprüfen, ob die AECII und AECI-ähnlich grundsätzlich gleiche Zytokinprofile aufweisen bzw. es zu einer unterschiedlichen inflammatorischen Reaktion beider Zelltypen kommt, wurde in den Proben zusätzlich IL-8 und IL-6 gemessen. Während für IL-8 kein Unterschied zwischen den beiden Zelltypen zu detektieren war (Abb. 28B), zeigte sich, dass AECI-ähnlich nach IL-1 β Stimulation signifikant mehr IL-6 produzieren als AECII (Abb. 28C). Im Gegensatz zu GM-CSF und IL-6 war eine leichte Induktion von IL-8 aus AECII nach *S. pneumoniae* D39 Infektion zu sehen (Abb. 28B).

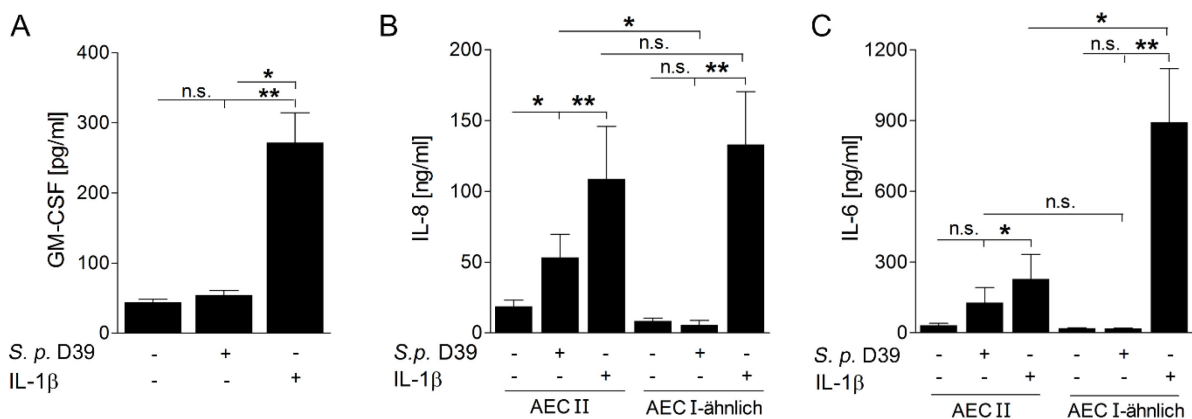


Abbildung 28: IL-1 β induziert die Sekretion von GM-CSF, IL-8 und IL-6 aus humanen AECI-ähnlich.

(A-C) Humane AECI-ähnlich und (B, C) primäre humane AECII wurden für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI 0,5) infiziert bzw. mit IL-1 β (5 ng/ml) stimuliert. In den Kulturüberständen wurde die Menge an gebildetem (A) GM-CSF, (B) IL-8 und (C) IL-6 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (A-E) aus mindestens je drei verschiedenen Patientenproben. (* p <0,05; ** p <0,01; Mann-Whitney-Test).

4 Diskussion

Eine adäquate inflammatorische Reaktion des angeborenen Immunsystems auf pulmonale mikrobielle Infektionen ist mit der kontrollierten Freisetzung anti- und proinflammatorischer Zyto- und Chemokine und der daraus resultierenden Aktivierung einer erregerspezifischen Wirtsabwehr verbunden (Standiford, T., 1996; Nelson, 1995). Infolge einer vorhergehenden antiviralen Immunantwort können antibakterielle Reaktionen auf nachfolgende Infektionen stark beeinflusst werden, so dass die eingeschränkte Abwehr bakterieller Erreger zur Schädigung des respiratorischen Epithels und mitunter zum ARDS führen kann. *In vivo* Studien an Mäusen identifizierten viral induzierte Interferone als wesentlichen Faktor der veränderten antibakteriellen Immunantwort (Sun, 2008; Shahangian, 2009; Li, W, 2012). In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese der interferonvermittelten Modulation inflammatorischer Reaktionen auf eine sekundäre bakterielle Infektion in humanem *ex vivo* infiziertem Lungengewebe nachvollzogen. Es konnte gezeigt werden, dass eine primäre Infektion mit einem IAV interferonabhängig zur Reduktion der *S. pneumoniae* induzierten Bildung von IL-1 β und GM-CSF auf Protein- und mRNA-Ebene führte. Vermutlich beeinflussen Typ I und II Interferone die Bildung von IL-1 β , welches über parakrine Wechselwirkungen rückwirkend an der Regulation der Bildung von GM-CSF, aber auch des Entzündungsmediators COX-2 beteiligt ist. Auf zellulärer Ebene führte die Infektion mit IAV zur Freisetzung von Interferonen aus AECII, welche die Bildung von IL-1 β in AM verhinderten. Als Konsequenz daraus unterblieb die IL-1 β regulierte Produktion von GM-CSF aus AECII. Zusätzlich wirkten die Interferone direkt unterdrückend auf die Freisetzung von GM-CSF. Die beschriebene Modulation der angeborenen Immunantwort, ausgelöst durch die IAV induzierte Blockade der Sekretion des pneumokokkeninduzierten proinflammatorischen Zytokins IL-1 β und der daraus resultierenden ausbleibenden Bildung von GM-CSF, kann die Funktion der AM und folglich die antibakterielle Immunabwehr beeinflussen (Abb. 29).

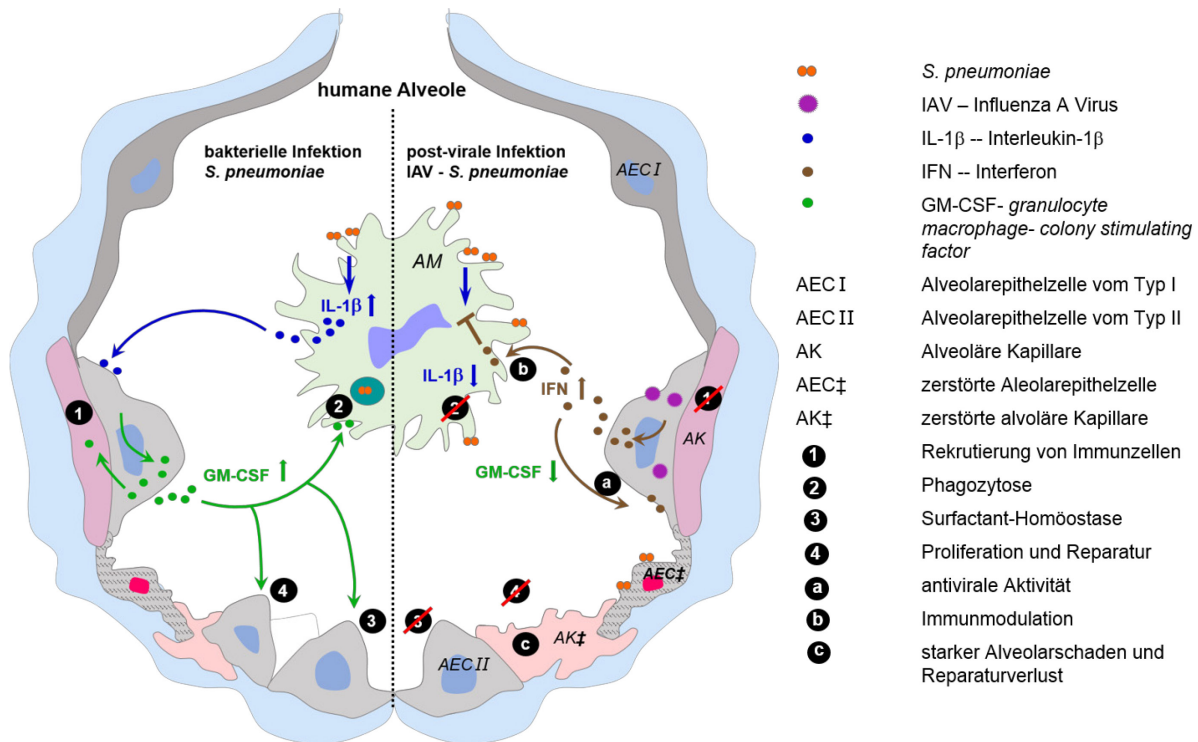


Abbildung 29: Modell alveolärer Zellinteraktionen ausgelöst durch Zytokine der frühzeitigen Immunantwort während bakteriell- und virusassoziierter sekundärer bakterieller Infektion.

Auf der linken Seite wird *S. pneumoniae* von AM erkannt, welche daraufhin inflammationsabhängig IL-1β freisetzen. Dieses induziert nachfolgend die Bildung von GM-CSF aus AECII. Sehr wahrscheinlich unterstützt GM-CSF die inflammatorische Reaktion indem es sich an der Rekrutierung von Immunzellen, Phagozytosefunktion, der Surfactanthomöostase sowie der Initiation von Proliferations- und Reparaturprozessen beteiligt. Auf der rechten Seite löste die vorhergehende IAV Infektion eine antivirale Interferonantwort aus, welche zur Blockade der Expression von IL-1β und des von diesem regulierten GM-CSF führt. Der daraus resultierende Verlust protektiver Effekte, welche über GM-CSF vermittelt werden, kann letztendlich zur verstärkten Schädigung der Alveole beitragen.

4.1 Charakteristik grundlegender Parameter des *ex vivo* Lungenkulturmodells zur Untersuchung der Influenza A Virus assoziierten sekundären Pneumokokkenpneumonie

Die Analyse des viralen Wachstums zeigte, dass der verwendete humanpathogene saisonale IAV Stamm Pan/99(H3N2) ohne Zusatz von Trypsin effizient in *ex vivo* infiziertem humanem Lungengewebe replizierte. Binnen 16 h nach Infektionsbeginn, nach etwa zwei Replikationszyklen, nahm die gemessene Zahl infektiöser viraler Partikel deutlich zu und wies nach 24 h eine maximale Viruslast von durchschnittlich 10^6 pfu/ml auf. Daraus resultierend wurde selbige Konzentration von Pan/99(H3N2) als Ausgangsdosis für alle folgenden Koinfektionsversuche in den humanen Lungenkulturen verwendet. Im Gegensatz zu Studien an

Mäusen (Pittet, 2010) führte die vorangegangene Infektion mit IAV nicht zu einem verbesserten Wachstum der beiden getesteten *S. pneumoniae* Stämme D39 und dem klinischen Isolat ST3. Aufgrund der hohen Ausgangsdosis von *S. pneumoniae* war nach einer 16 stündigen Infektion wahrscheinlich bereits die maximale Pneumokokkenlast in den Lungenkulturen, bei der sich die Bakterien selbst limitieren, erreicht. Folglich kann unabhängig von der Virusinfektion kein weiteres Wachstum der Pneumokokken erfolgen. Zur Etablierung des Modells wurde lediglich getestet, ob die gewählten Konzentrationen beider Erreger das Lungengewebe schädigen bzw. die vorhergehende Infektion mit IAV das Pneumokokkenwachstum in den gewählten Konzentrationen beeinflusst. Um beurteilen zu können, ob eine IAV Infektion die Vermehrung von *S. pneumoniae* in *ex vivo* kultivierten Lungengewebekulturen begünstigt, sollte eine geringere initiale Pneumokokkendosis (10^2 cfu/ml) injiziert und das Wachstumsverhalten im Abstand von 2^oh über einen Gesamtzeitraum von ca. 8 h ermittelt werden. Doch auch unter diesen Bedingungen kann das in Mäusen beobachtete gesteigerte Bakterienwachstum infolge der IAV Infektion ausbleiben, was neben der Unterschiedlichkeit beider Versuchsmodelle in den unterschiedlichen Infektionszeitfenstern begründet liegen kann. In Mausstudien erfolgte die Sekundärinfektion mit Bakterien überwiegend nach erfolgreicher Beseitigung der Virusinfektion, wohingegen im humanen *ex vivo* Lungenmodell nur eine sehr kurze virale Vorlaufzeit besteht, welche für potentiell notwendige morphologische Änderungen des respiratorischen Epithels nicht ausreichend sein könnte. Die begünstigte Anheftung von Bakterien infolge der Schädigung des respiratorischen Epithels durch pathogene IV gehört zu den bekannten Mechanismen viral/bakterieller Kopathogenität. Mehrfach untermauerten murine *in vivo* Studien diese Hypothese (Harford, 1949; Loosli, 1975; Plotkowsi, 1986 und 1993; McCullers 2001 und 2002). Auch *post mortem* analysierte Gewebeproben von Opfern der „Spanischen Grippe“ zeigten eine verstärkte bakterielle Besiedlung geschädigten Lungengewebes, hier besonders durch grampositive Bakterien (Louria, 1959; Bisno, 1971; Morens, 2008). Sowohl *in vivo* an Mäusen (Manicassamy, 2010) als auch *ex vivo* an humanen Lungenkulturen (Weinheimer, 2012) konnte gezeigt werden, dass IV AECII infizieren, in ihnen replizieren und diese letztlich zerstören (Brydon, 2003; Weinheimer, 2012). Resultierend daraus kann beispielsweise infolge regenerativer Strukturierungsprozesse die Anzahl an Rezeptoren, welche Bakterien zur Anheftung nutzen können, erhöht werden. Während es sich bei den großen Ausbrüchen der IAV assoziierter sekundärer bakterieller Infektionen um pandemische IAV handelte, ist bekannt, dass saisonale IAV, wie das in der vorliegenden Studie verwendete Pan/99(H3N2), überwiegend im oberen Respirationstrakt replizieren und weniger zum Epithelschaden führen (Guarner, 2009). Möglicherweise verläuft die Begünstigung der

bakteriellen Adhäsion bei saisonalen IV über die Modifikation bestimmter Rezeptoren. Eine besondere Bedeutung scheinen dabei viralen Neuraminidasen zu besitzen, da die von ihnen gespaltene Sialinsäuren auf Wirtszellen als Rezeptoren für Bakterien fungieren können (McCullers, 2003, Peltola, 2005). In Mäusen zeigte der Einsatz rekombinanter IV Stämme, welche sich durch unterschiedliche Neuraminidasegene auszeichneten, dass mit einer erhöhten Aktivität der Neuraminidase eine gesteigerte bakterielle Anheftung einherging (McCullers, 2003).

Bei der Etablierung des Modells zur Untersuchung der IAV assoziierten sekundären Pneumokokkenpneumonie an *ex vivo* kultivierten Lungenkulturen zeigte sich, dass es durch die Koinfektion zu keinem erhöhten zytotoxischen Effekt gegenüber den Einzelinfektionen mit dem jeweiligen Erreger kam. Auch gegenüber der nichtinfizierten Kontrolle kam es lediglich zu einem marginalen Anstieg der LDH Freisetzung. Folglich ist keine der im Rahmen dieser Studie gemachten Beobachtungen auf eine erhöhte Zytotoxizität zurückzuführen, sondern als aktive Reaktion des Immunsystems auf die Erreger zu bewerten. Auch die immunhistologische Analyse der Gewebeproben zeigte, dass es morphologische kaum Unterschiede zwischen der nichtinfizierten Kontrolle, den einfach viral bzw. bakteriell und sukzessiv viral-bakteriell infizierten Proben gab. Die Immunhistologie stellt lediglich eine Momentaufnahme dar, so dass infolge der Probenprozessierung und Infektionsprozesse aus dem Gewebeverband herausgelöste Zellen möglicherweise nicht detektiert wurden. Dennoch zeigte die mikroskopische Analyse der Proben ein vergleichbar integriertes Bild des alveolären Gewebeverbandes und auch der Kernmorphologie innerhalb der verschiedenen Infektionen.

4.2 Influenza A Virus verursachte Interferoninduktion in humanen Lungenkulturen

Als Reaktion auf virale Infektionen bilden Interferone einen entscheidenden Bestandteil der angeborenen Immunität (Isaacs, 1957) und zeichnen sich dabei durch ein komplexes Aktivitätsspektrum aus. Neben ihrer limitierenden Wirkung auf die virale Replikation ist ihre Freisetzung mit weiteren antiviralen Eigenschaften assoziiert, indem sie mitunter die Transkription interferonstimulierter Gene und der über diese gebildeten Proteine regulieren (Pestka, 1987). Auch wenn sich die antiviralen Effekte verschiedener Spezies prinzipiell untereinander ähneln, regulieren Interferone hunderte nachgeschalteter Gene, so dass sie ein breitgefächertes Spektrum sekundärer Immunreaktionen verursachen. Dabei wird die Diversität der Wirkungen zusätzlich durch unterschiedliche speziesbedingte Interferonsubtypen verstärkt

(Platanias, 2005). So existieren beispielsweise dreizehn Subtypen des humanen IFN α (Typ I), welche alle über den gleichen Rezeptor (IFNAR) vermittelt werden (Gibbert, 2012), wohingegen vierzehn verschiedene murine IFN α kodierende Gene und zusätzlich drei weitere IFN α -Pseudogene bekannt sind (van Pesch, 2004). Die Ursache für die Vielfalt der IFN α Subtypen ist bisher ungewiss. Da es jedoch abhängig von Zellpopulation und induzierendem Stimulus zu einer unterschiedlichen Sezernierung der Subtypen kommt, welche mit funktionellen Unterschieden verbunden sind, scheint die Immunantwort dahinter einem klar definierten Regulationsmechanismus zu unterliegen (Szubin, 2008; Li, L, 2010).

Interferone sind an der Regulation der initialen angeborenen als auch der späteren Immunantwort durch das adaptive Immunsystem beteiligt (Le Bon, 2002; Schoenborn, 2007), davon ausgehend wurde ihre Sezernierung als Voraussetzung für eine adäquate Immunantwort auf die IAV Infektion der humanen Lungenkulturen gedeutet. Die Quantifizierung verschiedener Interferone im Kulturüberstand IAV infizierter Lungenkulturen zeigte, dass diese sowohl Typ I (IFN α 2 und IFN β) Typ II (IFN γ) als auch Typ III (IFN λ ₁) Interferone produzierten. Wie erwartet kam es nicht zu einer Verringerung der Interferonlevel durch die nachfolgende sekundäre Pneumokokkeninfektion, eine Zunahme trat ebenfalls nicht ein. In Mäusen führten bakterielle Erreger zu einer TLR vermittelten Induktion von Typ I Interferonen, insbesondere über TLR4 (Monroe, 2010). Die Gruppe um Sing *et al.* zeigte jedoch, dass lediglich gramnegative, nicht aber grampositive Bakterien wie *S. pneumoniae* die Sekretion von IFN β auslösten (Sing, 2000).

Besonders auffällig war die große Menge an IFN γ , welche durch die IAV Infektion in den humanen Lungenkulturen freigesetzt wurde. Auch wenn IFN γ selbst nicht zur Abwehr primärer IAV Infektionen benötigt wird (Graham, 1993; Doherty, 2006), ist seine Freisetzung unter anderem mit der verstärkten Expression des „Haupthistokompatibilitätskomplex II“ (MHCII) auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Zellen verbunden (Mach, 1996, Boss, 1997). IFN γ induziert diese Expression auch in AECII (Cunningham, 1994), dem Eintritts- und Replikationsort des IAV. Bekannt ist, dass IFN γ entscheidend an der Polarisation von Makrophagen in den klassisch aktivierten Makrophagenphänotyp (M1) beteiligt ist, (Gordon, 2005), welcher neben der Bildung proinflammatorischer Zytokine auch über die Regulation der „induzierbaren Stickstoff-Monoxidsynthase“ (iNOS) zur Bildung von Stickstoffmonoxid und somit zur angeborenen Immunabwehr beiträgt (MacMicking, 1997). Zusätzlich zeichnet sich der M1 Phänotyp durch eine verstärkte Expression von MHCII aus, welche ebenfalls durch IFN γ induziert wird

(Figueiredo, 1989) und bildet durch die Antigenpräsentation eine Brücke zum adaptiven Immunsystem (Schjetne, 2003). Die Polarisation der Makrophagen in dem M1 Phänotyp erfordert *in vitro* den Einsatz von mindestens 20 ng/ml an IFN γ (Martinez, 2006, Davis, 2013). Demnach ist es denkbar, dass die dafür erforderliche pathophysiologische Dosis im humanen Organismus ähnlich hoch sein muss, was eventuell die großen Mengen des durch die IAV Infektion induzierten IFN γ in den Lungenkulturen erklären könnte.

4.3 Differentielle Zytokinfreisetzung in humanen koinfizierten Lungenkulturen

Die Modulation der bakteriell induzierten Immunantwort durch eine vorangegangene primäre IAV Infektion kann entscheidend zur erhöhten Letalität der sekundären bakteriellen Pneumonie beitragen. Verschiedene Studien zeigten, dass in Mäusen die *S. pneumoniae* bedingte Bildung sowohl proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β (Smith, 2007), IL-6, KC (murines IL-8 Analogon) und TNF α (van der Sluijs, 2004; Smith, 2007) als auch die des antiinflammatorischen IL-10 (van der Sluijs, 2004; Smith, 2007) und des Chemokins MIP1 α (Smith, 2007) signifikant durch eine vorhergehende primäre virale Infektion erhöht wurden. Das Aufeinandertreffen viraler und bakterieller Faktoren führte zu einer verstärkten Inflammation, welche möglicherweise im Zusammenhang mit der erhöhten Morbidität und Mortalität während der sekundären bakteriellen Infektion steht. In den humanen Lungenkulturen hingegen veränderte die vorherige IAV Infektion die *S. pneumoniae* induzierte Bildung von IL-6, IL-8, IL-10 und TNF α nicht. Lediglich für TNF α war eine leichte, nicht signifikante Erhöhung zu erkennen. Besonders auffällig waren die bereits hohen initialen Werte von IL-8 und IL-6. Das respiratorische Epithel bildet eine Barriere zwischen der Lunge und den eindringenden Mikroorganismen und ist zudem eine Quelle für die Synthese von IL-8 (Standiford, T., 1990). Während inflammatorischer pulmonaler Krankheiten wie dem ARDS (Suter, 1992), Asthma (Marini, 1992) oder der COPD kommt es über die Aktivierung von NF- κ B und des „Aktivatorproteins 1“ (AP-1) (Anto, 2002; Murugan, 2009) zu einer verstärkten Bildung des biologisch multifunktionalem IL-8. Darüber hinaus ist IL-8 entscheidend an der krebsvermittelten Angiogenese und Tumorgenese beteiligt (Li, A, 2005). Zusätzlich zu den erwähnten pulmonalen Krankheiten, litt ein Großteil der an der Studie teilnehmenden Patienten primär unter einem Bronchialkarzinom, so dass die bereits initial hohen IL-8 Werte nicht verwunderlich waren. Darüber hinaus ist IL-8 im Verlauf der Wundheilung am chemotaktischen Anlocken von Neutrophilen und Fibroblasten beteiligt (Chodosh, 2000), eine gesteigerte Freisetzung infolge der starken Schädigung des Gewebes durch die

Lungenresektion ist daher denkbar. Ähnlich IL-8, wurden bei Lungenerkrankungen wie COPD (Grubek-Jaworska, 2012) oder Asthma (Yokoyama, 1995) hohe Level an IL-6 detektiert, was auch in der vorliegenden Studie ursächlich für die hohen initialen IL-6 Konzentrationen sein kann. Besonders interessant sind Langzeitstudien von COPD-Patienten in denen gezeigt wurde, dass erhöhte Serumlevel an IL-6, nicht aber IL-8 und TNF α , als Indikator für eine steigende Mortalität unter den Patienten bezeichnend waren (Celli, 2012). Somit kann IL-6 eventuell nicht zwingend als Parameter für verstärkte Inflammation, sondern vielmehr als Indikator für epithelialen Schaden gedeutet werden, welcher definitiv während der Lungenresektion auftrat. Im Gegensatz zu Mausversuchen führte die vorhergehende IAV Infektion zu einer signifikanten Reduktion der *S. pneumoniae* D39 bedingten Bildung von IL-1 β (Smith, 2007) und des hämatopoetischen Wachstumsfaktors GM-CSF (Shahangian, 2009). Diese Reduktion konnte nicht nur für *S. pneumoniae* D39, sondern auch für das klinische Isolat ST3 gemacht werden. Generell induzierte der ST3 eine quantitativ geringere Sekretion beider Faktoren, gleichwohl wurde diese IAV abhängig blockiert. Die unterschiedlich starke Induktion der Zytokine durch die verwendeten *S. pneumoniae* Serotypen kann durch das zytolytisch wirksame PLY bedingt sein, welches cholesterolabhängigen zur Porenbildung führt (Andrew, 1997; Gilbert, 1999). Derzeit existieren mindestens 16 verschiedene Proteinvarianten von PLY, welche eine unterschiedlich ausgeprägte hämolytische Aktivität aufweisen (Fatykhova, 2015). Während der Serotyp 2 (D39) den Alleltyp 1 besitzt, trägt der verwendete ST3 den Alleltyp 2 (Fatykhova, 2015), beide weisen jedoch eine ähnliche hämolytische Aktivität auf (Jefferies, 2007). Unabhängig von der hämolytischen Aktivität beeinflusst PLY, neben der Komplementaktivierung, die Induktion proinflammatorischer Mediatoren (Kadioglu, 2008), darunter auch IL-1 β (Shoma, 2008). Im Gegensatz zu *S. pneumoniae* ST3 handelt es sich bei *S. pneumoniae* D39 um einen invasiven Stamm. In Kindern beispielsweise zeigte eine Studie, dass invasive Erkrankungen mit *S. pyogenes* mit einem höheren Level an IL-1 β einhergingen als nichtinvasive (Wang, J, 2008). Auch in mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen waren erhöhte Level an IL-1 mit einer stärker invasiven Erkrankung verbunden (Marriott, 2012). Eine durch das IAV bedingte Bildung von IL-1 β , wie sie *in vivo* an Mäusen (Allen, 2009, Thomas, 2009) beschrieben, konnte in den humanen Lungenkulturen nicht festgestellt werden.

4.4 Folgen der interferoninduzierte Suppression von IL-1 β und GM-CSF

Mehrfach wurden Interferone in Mäusen als Gruppe virusinduzierter Faktoren identifiziert, welche die Abwehr der sekundären bakteriellen Infektion beeinflussen (Sun, 2008; Shahangian,

2009; Li, W, 2012). Dennoch besteht eine Diskrepanz darüber, welcher der drei Interferontypen (einschließlich ihrer Subtypen) bzw. welche Kombination an Interferonen entscheidend zur erhöhten Suzeptibilität sekundärer bakterieller Infektionen beiträgt. In Anbetracht dessen, dass keine andere Spezies von den Folgen der IAV assoziierten sekundären bakteriellen Pneumonie stärker betroffen ist als der Mensch, ist es möglich, dass die humanspezifische Diversität der interferoninduzierten Effekte innerhalb der antimikrobiellen pulmonalen Immunantwort zur Letalität solcher Superinfektionen beiträgt.

Murine *in vivo* Studien adressierten größtenteils IFN β und IFN γ , basierend darauf wurden diese sowohl auf ihre Einzelwirkung als auch auf ihre kombinierte Effektivität bezüglich der *S. pneumoniae* induzierten Immunantwort in humanen Lungenkulturen untersucht. Beide Interferone unterdrückten signifikant die Induktion von IL-1 β , wohingegen die alleinige Applikation von IFN γ die GM-CSF Produktion zwar reduzierte, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie es die Infektion mit IAV bzw. die Stimulation mit IFN β tat. Verglichen mit der Einzelstimulation verstärkte die kombinierte Applikation beider Interferone sowohl die Reduktion von IL-1 β als auch die von GM-CSF, was auf einen synergistischen Effekt beider Interferone schließen lässt. Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Studie generierten Daten unterdrückten in Mäusen sowohl Typ I (Guarda, 2011) als auch Typ II (Eigenbrod, 2013) Interferone die Bildung von IL-1 β . Dadurch bedingt kann es wiederum zur Beeinträchtigung frühzeitiger Mechanismen der angeborenen, aber auch der adaptiven Immunität kommen. Zudem beeinflussten Typ I Interferone *in vitro* die Sekretion von GM-CSF in humanen mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarkes (Aman, 1994).

Unumstritten ist der protektive Einfluss von IL-1 β als Immunmodulator infolge bakterieller Infektionen IL-1 β (Vogels, 1995; Kafka, 2008). Doch auch für GM-CSF konnte gezeigt werden, dass es neben seiner klassischen Rolle als hämatopoetischer Wachstumsfaktor (Burgess, 1977) regulierend auf Inflammationsprozesse wirkt (Hamilton, 1980). In Mäusen zeigte GM-CSF eine protektive Wirkung in der Abwehr viraler Infektionen (Sever-Chroneos, 2011; Unkel, 2012) und bakterieller Erreger in der Pneumokokkenpneumonie (LeVine, 1999; Steinwede, 2011; Yamamoto, 2014) bzw. gegenüber einer sekundären Staphylokokkeninfektion infolge einer vorhergehenden Infektion mit IAV (Subramaniam 2014; 2015). Die von GM-CSF ausgehenden antibakteriellen Effekte auf die Infektion mit *S. pneumoniae* (Steinwede, 2011) und *S. aureus* (Subramaniam, 2014) unterschieden sich in Mäusen interessanterweise erregerspezifisch. Während es bei der Abwehr von Pneumokokken zur verstärkten Rekrutierung von Makrophagen, nicht aber Neutrophilen kam (Steinwede, 2011), führt es während der Infektion mit *S. aureus* zur Rekrutierung beider Zellpopulation

sowie zur verstärkten Bildung von ROS und einer erhöhten Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, MCP-1 und Amphiregulin (Subramaniam; 2014; 2015).

Über die gesteigerte Bildung des SP-A Rezeptors SP-R210 (Sever-Chroneos, 2011) vermittelte GM-CSF in murinen *in vivo* Studien zudem die Aufnahme von IAV durch Makrophagen (Benne, 1997), so dass ein Ausbleiben von GM-CSF auch zur Begünstigung viraler Infektionen beitragen kann. Zudem steigerte GM-CSF in Mäusen die Bildung des Scavenger-A Rezeptors MARCO, dabei zeigte sich, dass MARCO defiziente Mäuse resistenter gegenüber viraler Infektionen waren als solche die MARCO exprimierten (Sever-Chroneos, 2011, Ghosh, 2011). Ebenfalls in Mäusen führte $\text{IFN}\gamma$, dessen Sekretion durch die IAV Infektion in den humanen Lungenkulturen stark induziert wurde, zu einer Verringerung der Expression von MARCO, was wiederum zu einer verminderten Phagozytoseleistung der AM führte (Sun, 2008). Der überwiegend vertretenen Hypothese einer fördernden Wirkungen von Interferonen auf die Entstehung sekundärer bakterieller Infektionen (Sun, 2008; Shahangian, 2009; Li, W, 2012) steht eine aktuelle Studie von Robinson *et al.* gegenüber. Die Gruppe zeigte, dass $\text{IFN}\lambda_2$ in Mäusen eine protektive Funktion gegenüber einer sekundären *S. aureus* Infektion zu haben scheint, indem es verstärkend auf die Bildung von MARCO wirkt (Robinson, 2015).

Zusätzlich ist GM-CSF über den myeloidspezifischen Transkriptionsfaktor PU.1 (Karpurapu, 2011) an der Polarisation von Makrophagen in den antimikrobiell aktiven M1 Phänotyp beteiligt (Jaguin, 2013), indem verstärkt Rezeptoren des angeborenen Immunsystems exprimiert werden (Krausgruber, 2011). Die Suppression von GM-CSF würde sich demnach auch auf die Aktivität der Makrophagen auswirken und die Ausprägung des immunsuppressiven alternativen Makrophagenphänotyps (M2) (Jaguin, 2013) forcieren. Potentiell kann das verstärkte Auftreten des M2 Phänotyps zur beeinträchtigten Abwehr sekundärer bakterieller Erreger infolge der vorangegangenen IAV Infektion führen. Für *in vitro* (Lacey, 2012, Rey-Giraud, 2012) Versuche waren allerdings erhebliche Mengen an appliziertem GM-CSFs nötig (bis zu 100xfache Menge der in den Lungenkulturen gemessenen Dosis), um die Aktivierung des M1 Status zu erreichen. Demgegenüber steht, dass unter anderem auch $\text{IFN}\gamma$ ein potenter Faktor zur Polarisation Richtung M1 Phase ist, so dass die Unterdrückung von GM-CSF nicht zur Verhinderung der Polarisation von Makrophagen in den M1 Status führen muss. Innerhalb der ersten Woche nach der IAV Infektion kam es in Mäusen zu einem 90%em Verlust residenter AM, begleitet von einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer sekundären Pneumokokkeninfektion, welche durch die Applikation von GM-CSF aufgehoben werden konnte (Ghoneim, 2013). Zwei Wochen nach der initialen IAV Infektion waren der Verlust an AM und die damit einhergehende verringerte Immunität wieder

ausgeglichen (Ghoneim, 2013). Methodisch bedingt kann jedoch die Rekrutierung funktionsfähiger AM im humanem Lungenmodell bislang nicht nachvollzogen werden.

Bislang bleibt das Verständnis über die Rolle von GM-CSF für die Abwehr von IAV lückenhaft. Resultierend aus den genannten Studien scheint die Induktion von MARCO jedoch ein wichtiger Bestandteil der AM vermittelten bakteriellen Immunantwort zu sein, welcher interferonabhängig reguliert wird. Obwohl die Deletion von GM-CSF zu keiner Störung der Hämatopoese in Mäusen führte, kam es zur Entwicklung von Abnormalitäten der Lunge (Stanley, 1994) sowie der Störung des pulmonalen Metabolismus von Surfactant (Dranoff, 1994) und einer schnelleren Entwicklung pulmonaler, aber auch systemischer Erkrankungen infolge verschiedener Pathogene (Seymour, 1997; LeVine, 1999, Steinwede, 2011). GM-CSF reguliert in AM das Recycling von Surfactantproteinen über den Transkriptionsfaktor PU.1 (Shibata, 2001), so dass fehlendes GM-CSF zur Akkumulation von Surfactant führt, was beim Menschen in der Entstehung der Alveolären Proteinose resultieren kann (Bonfield, 2003). Für dieses Krankheitsbild konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es ein erhöhtes Risiko zusätzlicher bakterieller Infektionen mit sich bringt (Punatar, 2012).

4.5 IL-1 β regulierte Sekretion von GM-CSF in humanen Lungenkulturen

Die Expression von epithelalem GM-CSF verläuft in Mäusen abhängig von TNF α (Cakarova, 2011). Da in den humanen Lungenkulturen keine Beeinflussung der Sekretion von TNF α durch das IAV erfolgte, wurde auf Basis der Studie von Cakarova *et al.* eine IL-1 β abhängige Regulation von GM-CSF untersucht. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Lungenkulturen mit IL-1 β eine den Pneumokokken vergleichbare Induktion an GM-CSF verursachte, welche durch die Blockierung des IL-1 Rezeptors mittels Anakinra sowohl in der mit IL-1 β stimulierten als auch in der mit *S. pneumoniae* infizierten Probe aufgehoben werden konnte. Die Stimulation des Gewebes mit TNF α führte lediglich zu einer schwachen Induktion von GM-CSF, welche durch die vorherige Applikation von Anakinra völlig blockiert wurde. Möglicherweise verursachte die mechanische Belastung während der Injektion von TNF α in die Lungenkulturen oder das applizierte TNF α selbst die Bildung geringer Mengen an IL-1 β , welches wiederum GM-CSF induzierte. Zur Überprüfung der Effektivität des verwendeten TNF α wurde ein Western Blot auf die über TNF α induzierbare COX-2 (Chen, 2000) durchgeführt, welcher bestätigte, dass TNF α die Bildung der COX-2 im Lungengewebe induzierte. Daraus schlussfolgernd ist das verwendete TNF α im Lungengewebe

immunmodulatorisch aktiv, hat selbst jedoch keinen direkten Effekt auf die Freisetzung von GM-CSF. Um regulierend auf die Bildung von GM-CSF wirken zu können, muss IL-1 β chronologisch vor GM-CSF gebildet werden. Konsistent mit seiner Rolle als proinflammatorischer Mediator in der frühzeitigen Immunantwort (Mizgerd, 2012), induzierte die Infektion des Lungengewebes mit *S. pneumoniae* die messbare Sekretion von IL-1 β nach etwa 4-8 h. GM-CSF hingegen konnte erst etwa 8-16 h nach Infektionsbeginn detektiert werden, was die Hypothese der IL-1 β regulierten GM-CSF Bildung unterstützt. Trotz der Tatsache, dass IL-1 β einen essentiellen Bestandteil der angeborenen Immunität darstellt, kann sein Fehlen in einigen Bereichen redundant durch andere proinflammatorische Zytokine und endogene Stimuli kompensiert werden. Im Gegensatz dazu scheint die bakterieninduzierte Bildung von GM-CSF exklusiv über IL-1 β reguliert zu werden. Die von der Gruppe um Rollwagen *et al.* beschriebene Induzierbarkeit durch IL-6 in murinen Zellen aus der Milz (Rollwagen, 2004) konnte in dem humanem Lungengewebe nicht nachvollzogen werden, da die Bildung von IL-6 nicht durch die Virusinfektion supprimiert wurde, die Bildung von GM-CSF jedoch trotz Anwesenheit von IL-6 ausblieb.

4.6 Ursachen der interferoninduzierten Blockade der IL-1 β Bildung in Lungenkulturen

Die Synthese von IL-1 β wird über einen NF- κ B abhängigen Signalweg reguliert, der durch verschiedene pathogenassoziierte Faktoren aktiviert werden kann (Witzenrath, 2011). In einem zweistufigen Prozess wird zunächst eine inaktive Vorstufe des IL-1 β , bezeichnet als pro-IL-1 β , transkribiert (Singer, 1988), welches in einem zweiten Schritt durch die inflammasominduzierte autokatalytische Aktivierung der Caspase-1 in seine aktive Form überführt wird (Thornberry, 1992). Innerhalb der streng regulierten Bildung von IL-1 β gibt es folglich mehrere potentielle Ebenen an welchen die blockierende Wirkung der Interferone erfolgen kann.

Die densitometrische Quantifizierung von pro-IL-1 β aus Lungenkulturen im Western Blot zeigte, dass in den vorab mit Interferon stimulierten Proben weniger pro-IL-1 β nach der Infektion mit *S. pneumoniae* D39 zu detektieren war als in den nicht zuvor mit Interferon behandelten Proben. Auch auf Transkriptionsebene verhinderte eine vorhergehende Behandlung der Lungenproben mit IFN β + IFN γ die *S. pneumoniae* induzierte Transkription von pro-IL-1 β mRNA. Versuche der Gruppe um Eigenbrod *et al.* deuteten darauf hin, dass IFN γ die Bildung von IL-1 β nicht nur über die ausbleibende Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms

unterbindet, sondern auch über eine transkriptionelle Stilllegung des IL-1 β Gens, bei der die Bindung der NF- κ B p65 an den Promotor von IL-1 β selektiv verhindert wird (Eigenbrod, 2013). Auch die Gruppe um Aman *et al.* zeigte in humanen Knochenmarkszellen, dass vermittelt über IFN α die Expression der IL-1 β mRNA herunterreguliert wurde, was gleichzeitig mit der verstärkten Bildung von IL-1RA einherging (Aman, 1994). Dementgegen konnte durch die Infektion mit IAV bzw. der Stimulation mit IFN β + IFN γ in den humanen Lungenkulturen keine erhöhte Bildung von IL-1RA gegenüber der mit *S. pneumoniae* D39 infizierten Probe festgestellt werden (Anhang 4). Entsprechend der Quantifizierung von IL-6 und IL-8 zeigte sich, dass bereits in der nichtinfizierten Kontrolle hohe Level an IL-1RA detektiert wurden (Anhang 4). Wahrscheinlich dient die verstärkte Bildung von IL-1RA der Suppression postoperativer Inflammation (Di Padova, 1991; O Nualláin, 1993), dabei besteht ein Ungleichgewicht zwischen der erhöhten Expression von IL-1RA ohne eine begleitende Erhöhung des IL-1 β nach operativem Stress (Nualláin, 1993). Dieser Befund spiegelt sich auch in den Lungenkulturen wider, da in der nichtinfizierten Kontrolle deutlich weniger IL-1 β als IL-1RA detektiert wurde. IL-1 β trägt entscheidend zur Differenzierung immunkompetenter Leukozyten bei, so dass die erhöhte Bildung von IL-1RA möglicherweise zur operativ bedingten immunologischen Depression beiträgt. Da sehr große Mengen an IL-1RA nötig sind um *in vitro* den inflammatorischen IL-1 β vermittelten Effekten entgegenzuwirken (O Nualláin, 1993), müsste die Rolle der endogenen postoperativen IL-1RA Bildung für das Immunsystem hinsichtlich der IL-1 β Suppression, auch hinsichtlich unterschiedlicher gesundheitlicher und klinischer Parameter, weiter untersucht werden.

4.7 Keine Beeinflussung der inflammasomregulierten Bildung von IL-18

Entsprechend IL-1 β wird auch die Bildung von IL-18 über einen zweistufigen Prozess reguliert, welcher über die Beteiligung des Inflammasoms verläuft (Gu, 1997). Dennoch wurde die *S. pneumoniae* ausgelöste Sekretion von IL-18 in den Lungenkulturen nicht durch eine vorherige IAV Infektion unterdrückt. Dasselbe Resultat zeigte sich auf transkriptioneller Ebene, obwohl die bakterielle induzierte Expression der pro-IL-18 mRNA generell deutlich schwächer war als die der pro-IL-1 β mRNA. Puren *et al.* beschrieben eine konstitutive Expression der mRNA von pro-IL-18 in nicht stimulierten PBMCs, nicht jedoch der für pro-IL-1 β (Puren, 1999). Darüber hinaus führte die Stimulation der Zellen mit LPS nur zu einer geringen Induktion der IL-18 Transkription, aber zu einer starken Bildung der IL-1 β mRNA (Puren, 1999), wie es auch in

den Lungenkulturen mit *S. pneumoniae* zu beobachten war. Mehrfach deuteten verschiedene Studien bereits eine IFN γ vermittelte transkriptionelle Suppression der LPS induzierten Bildung von IL-1 β an (Chujor, 1996; De Boer, 2001). Möglicherweise liegt die in Kapitel 4.6. beschriebene IFN γ vermittelte selektive Blockade der Bindung der p65 an den IL-1 β Promotor (Eigenbrod, 2013) der differenzierten Expression beider Zytokine zugrunde. Auch wenn in besagter Studie die Transkription der pro-IL-18 mRNA selbst nicht quantifiziert wurde, bestätigt sie die Selektivität dieser Blockade, da andere proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-6 nicht beeinflusst wurden (Eigenbrod, 2013). Möglicherweise deutet die Redundanz der interferonvermittelten Suppression der IL-1 β Bildung auf zwei unterschiedlichen Ebenen (transkription- und inflammasomvermittelt) den Einfluss dieser viralen Strategie für den Verlauf der sekundären bakteriellen Infektion an.

Der Beitrag des Inflammasoms zur Abwehr von *S. pneumoniae* durch die Generierung von IL-1 β (Witzenrath, 2011) und IL-18 (Fang, 2011) ist unumstritten, weit weniger eindeutig ist die Rolle des Inflammasoms innerhalb viraler Infektionen. Zeigten IAV infizierte Caspase-1 defiziente Mäuse höherer virale Titer als Wildtypmäuse (Huang, CH, 2013), wurde in anderen Studien kein Einfluss auf die Viruslast, sondern auf den Schutz des Epithels nach IAV Infektion festgestellt (Thomas, 2009). Dementgegen steht die verringerte Expression antiviraler Gene wie IFN α , IFN β , RIG-I und IP-10 in IAV infizierten Trachealepithelzellen Caspase-1 defizienter Mäuse, welche von einer gleichzeitigen Verringerung der viralen Replikation begleitet war (Bauer, 2012). Im Gegensatz zu murinen *in vivo* Studien, in denen eine IAV Infektion Caspase-1 abhängig die Bildung von IL-18 induzierte (Thomas, 2009), konnte in den humanen Lungenkulturen, entsprechend der Befunde von IL-1 β , keine IAV induzierte Freisetzung von IL-18 detektiert werden. Die Frage nach dem Nutzen der interferonbedingten Blockade für IAV selbst ist daher nicht eindeutig zu beantworten. Die interferonverursachte Inhibierung des NLRP3-Inflammasomes und die damit einhergehende Blockierung der IL-1 β Sekretion wurde im *ex vivo* infizierten Koinfektionsmodell nicht weiter analysiert, da die Suppression schon vor der Prozessierung des IL-1 β Vorläuferproteins pro-IL-1 β stattfand. Ob zusätzlich eine derartige Inaktivierung des NLRP3-Inflammasoms vorliegt bzw. es gar nicht zur Ausbildung dieses Proteinkomplexes kommt, kann erst beurteilt werden, wenn beispielsweise dessen Bildung oder die Funktionalität der Caspase-1 näher analysiert werden.

4.8 Suppression der IL-1 β induzierten COX-2 in koinfiziertem Lungengewebe

Im Rahmen bakterieller Infektionen ist IL-1 β über die Aktivierung der „mitogenaktivierten-Protein Kinasen“ an der Induktion des Entzündungsmediators COX-2 beteiligt (Molina-Holgado, 2000). Die interferonvermittelte Suppression der bakteriell induzierten Bildung von IL-1 β führte ebenfalls zu einer verringerten Transkription der COX-2 mRNA. Im Western Blot zeigte sich, dass auch auf Proteinebene eine Reduktion der *S. pneumoniae* induzierten Bildung der COX-2 infolge der vorherigen Infektion mit IAV stattfand, welche sich in der densitometrischen Quantifizierung bestätigte. Da die Expression der COX-2 nicht exklusiv über IL-1 β , sondern redundant auch über andere proinflammatorische Stimuli wie TNF α in humanen NCI-H292 Epithelzellen (Chen, 2000) und murinen RAW 264.7 Zellen (Giroux, 2000) bzw. Endotoxinen wie LPS (Giroux, 2000) ausgelöst werden kann, war eine vollständige Suppression der Bildung von COX-2 unwahrscheinlich, der Einfluss von IL-1 β aber dennoch nachvollziehbar. Zudem zeigte die Gruppe um Giroux *et al.* eine Induktion der COX-2 durch IFN γ in murinen RAW-264.7-Zellen (Giroux, 2000), dessen Freisetzung in den humanen Lungenkulturen durch die IAV Infektion detektiert wurde. Entgegen dieser Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Induktion der COX-2 in der lediglich IAV infizierten Probe nachvollzogen werden.

Pathophysiologisch relevant ist die Frage, ob die beobachtete quantitative Reduktion der COX-2 auch zu qualitativen Effekten führt. Um dies zu beurteilen kann beispielsweise die COX-2 induzierten Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2) (Phipps, 1991; Kalinski, 2012) in den Überständen der Lungenkulturen ermittelt werden. Die Infektion mit *S. pneumoniae* verursacht die Bildung von PGE2 aus verschiedenen Zellpopulationen und führt zur lokalen Attraktion von Makrophagen während früher Phasen der bakteriellen Infektion (Kalinski, 2012). Darüber hinaus wiesen Patienten mit akuter Pneumonie eine starke Bildung der COX-2 in AECII auf, *in vitro* zeigten aber neben diesen auch AM und Endothelzellen eine zeitabhängige Bildung der COX-2 und auch der PGE2 Synthese nach Infektion mit *S. pneumoniae* (Szymanski, 2012). Damit übereinstimmend zeigten im Western Blot auch die aus humanem Lungengewebe isolierten primären AECII eine verstärkte Expression der COX-2 nach Infektion mit *S. pneumoniae* bzw. nach Stimulation mit IL-1 β .

4.9 Zelluläre Grundlagen

4.9.1 Immunreaktionen von AECII und AM

AECII wurden als primärer Replikationsort humaner saisonaler IAV im humanen Lungengewebe identifiziert (Weinheimer, 2012) und bilden folglich den Ausgangspunkt einer IAV assoziierten sekundären bakteriellen Pneumonie. AM sind sowohl während bakterieller als auch viraler Infektionen stark an der Bildung pro- und antiinflammatorischer Zyto- und Chemokine beteiligt. (Broug-Holub, 1997; Kooguchi, 1998; Knapp, 2003; Beck-Schimmer, 2005). Da GM-CSF, dessen Freisetzung durch die vorherige Infektion mit IAV in mit *S. pneumoniae* infiziertem Lungengewebe unterdrückt wurde, entscheidend zur Aktivierung von AM beiträgt (Krausgruber, 2011), aber auch protektiv auf die epitheliale Lungenbarriere infolge oxidativen Stresses wirkt (Paine, 2003), wurden beide Zellpopulationen aus dem humanem Lungengewebe isoliert und auf ihre Immunantworten bezüglich der Infektionen mit Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39 analysiert. In der Phänotypisierung zeigte sich, dass beide Zelltypen positiv für ihre jeweiligen Marker waren, AM für CD68 und AECII für pro-SP-C sowie Pan-Cytokeratin. Bereits fünf Tage nach Isolation der AECII transdifferenzierten diese zu mehr als 50 % zu AECI-ähnlich. Entgegen der Physiologie der Alveole, in welcher ein Gemisch beider AEC Typen vorkommt, sah der experimentelle Ansatz dieser Arbeit die Verwendung möglichst reiner AECII bzw. in ausgewählten Versuchen reiner AECI-ähnlich vor. Erste Versuche mit AECII und AM zeigten, dass ausschließlich AECII Typ I (IFN α und IFN β), Typ II (IFN γ) und Typ III (IFN λ_1) infolge einer IAV Infektion sezernierten. Damit übereinstimmend konnte in anderen Studien die Freisetzung von Typ I und III Interferonen aus A549-Zellen (Sutejo, 2012), humanen AEC (Wu, 2015) und auch aus humanem Lungengewebe (Wu, 2012) gezeigt werden, nicht jedoch für IFN γ . Derzeit gelten aktivierte T-Lymphozyten als primäre Produzenten von IFN γ , so dass es stärker in die antivirale adaptive als in die antivirale angeborene Immunantwort integriert ist (Killip, 2015). Vermutlich ist die Zahl aktivierter T-Lymphozyten im humanen *ex vivo* Lungenmodell gering, somit konnten in diesem Modellsystem AECII, nicht aber AM als Quelle der IFN γ Bildung identifiziert werden. Demgegenüber wurde *in vitro* gezeigt, dass humane AM nach Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* ebenfalls IFN γ sezernierten (Fenton, 1997). In anderen Studien sezernierten murine AM infolge einer Virusinfektion IFN α (Kumagai, 2007) und sowohl murine als auch humane AM IFN β (Högner, 2013). Basierend auf dem von Weinheimer *et al.* gezeigten nahezu exklusiven Infektions- und Replikationsverhalten saisonaler humaner IAV in AECII (Weinheimer, 2012), ist die ausbleibende Interferonfreisetzung aus isolierten AM und deren

alleinige Sezernierung aus AECII in der vorliegenden Arbeit nachvollziehbar. Innerhalb der Alveole ist es dennoch möglich, dass durch ein von infizierten AECII vermitteltes Signal die Freisetzung von Interferonen aus anderen Zellpopulationen ausgelöst wird. In Relation zu den humanen Lungengewebekulturen wurde ein Großteil der Gesamtmenge an IFN α , IFN β und IFN λ_1 aus AECII gebildet, wo hingegen ihr Anteil an der Freisetzung von IFN γ im Bezug zum Gesamtgewebe geringer war, was auf eine zusätzliche Freisetzung aus anderen Zellpopulationen im Gewebe deutet. Verglichen mit den anderen Interferonen war die absolute Menge an freigesetztem IFN γ deutlich größer und spiegelt relativ betrachtet das im Gesamtgewebe ermittelte Interferonprofil wider.

Im Gegensatz dazu sezernierten ausschließlich AM nach Infektion mit *S. pneumoniae* D39 IL-1 β und TNF α , obwohl gezeigt wurde, dass primäre humane AECII sowohl mRNA als auch funktionale Proteine für TLR2 und TLR4 exprimieren (Armstrong, 2004). Da sich IL-1 β als entscheidender Mediator für die GM-CSF Produktion in den humanen Lungenkulturen herausstellte, die isolierten AECII dieses jedoch nicht nach der Infektion mit Pneumokokken bildeten, wurde rekombinantes IL-1 β extern appliziert. Wie vermutet produzierten die AECII nach Infektion mit *S. pneumoniae* D39 aufgrund fehlender IL-1 β Induktion kein GM-CSF, erst die Stimulation mit IL-1 β bewirkte dessen Sezernierung. Hingegen zeigte sich, dass die humanen AM IL-1 β , jedoch kein GM-CSF produzierten. Armstrong *et al.* machten anhand der Bildung von IL-8 die Funktionalität der TLRs auf den AECII fest (Armstrong, 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Quantifizierung von IL-8, dass AECII sowohl nach Stimulation mit IL-1 β als auch pneumokokkenvermittelt IL-8 produzierten, wenn auch geringfügiger als nach Applikation von IL-1 β . Dasselbe Resultat zeigte auch die densitometrische Quantifizierung der COX-2 in den AECII, welche geringfügig durch Pneumokokken, stärker aber durch die direkte Applikation von IL-1 β induziert wurde. Da die AM infolge der IAV Infektion kein Interferon produzierten, welches ausschlaggebend für die Suppression der IL-1 β Bildung war, wurden die Zellen vorab mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ stimuliert und darauffolgend mit *S. pneumoniae* infiziert. Auch auf zellulärer Ebene blockierten die Interferone die Freisetzung von IL-1 β und hatten, wie bereits im Lungengewebe, keinen Einfluss auf die Freisetzung von TNF α . Zudem induzierten auch pathophysiologisch gebildete Mengen an IL-1 β , welche über die Infektion vom AM mit *S. pneumoniae* D39 generiert wurden, die Freisetzung von GM-CSF aus AECII. Durch Zentrifugation der von den infizierten AM abgenommenen Kulturüberstände vor Inkubation mit den AECII konnte ausgeschlossen werden, dass die Sezernierung von GM-CSF direkt über die Pneumokokken selbst vermittelt

stattfand. Zusätzlich bestätigte ein ELISA, dass die infizierten AM kein GM-CSF in den Überstand sezernierten.

Entsprechend der Ergebnisse aus den Lungenkulturen kam es in Folge der Blockade des IL-1 Rezeptors mit Anakinra zur Suppression der IL-1 β vermittelten GM-CSF Bildung, so dass Rückschlüsse auf mögliche zelluläre Grundlagen der im Gesamtgewebe beobachteten Effekte geschlossen werden können. Subramanian *et al.* zeigten, dass es in Mäusen zu einer Erhöhung der Zahl an AM nach lokaler Applikation von GM-CSF kam (Subramanian, 2014), damit einhergehend führte die Infektion mit IAV *in vivo* zu einer Depletion residenter AM innerhalb der ersten Woche nach Infektion und somit zu einer verringerten AM vermittelten bakteriellen Abwehr (Ghoneim, 2013). Diese konnte durch die Applikation von GM-CSF wieder hergestellt werden (Ghoneim, 2013), so dass fehlendes GM-CSF mit zur gesteigerten Pathogenität infolge IAV assoziierter sekundärer bakterieller Pneumonien beitragen könnte. Da AM nicht nur für die Phagozytose von Pathogenen, sondern durch die Sekretion von Zyto- und Chemokinen auch zur Aktivierung und Rekrutierung anderer inflammatorischer Zellen beitragen (Sibille, 1990; Hauschildt, 1995), ist infolge der veränderten angeborenen Immunantwort ein Auftreten sekundärer bakterieller Infektion innerhalb der ersten Woche nach IAV Infektion möglich. Neben der veränderten Immunität kann das Fehlen der AM zur Einschränkung der pulmonalen Homöostase führen, welche den Organismus zusätzlich belastet. Nach etwa zwei Wochen kam es in den infizierten Mäusen zur Wiederherstellung der ursprünglichen Menge an AM, damit einhergehend kann eine Normalisierung der Sekretion von IL-1 β und GM-CSF erfolgt sein, da keine Verringerung beider Mediatoren im murinen System während der Post-Influenzapneumonie beschrieben worden ist (Ghoneim, 2013). Neben der Unterteilung von Makrophagen anhand ihres Phänotyps in Abhängigkeit lokaler Bedingungen (M1/M2 Phase) besteht eine traditionellere Aufteilung in die Klassen „proinflammatorischer Makrophagen“ und „alternativ aktivierter Makrophagen“ (AAM). Während erstere Klasse an der frühzeitigen Abwehr mikrobieller Infektionen beteiligt ist, sind die AAM kaum antibakteriell wirksam (Mosser, 2008). Die Gruppe um Chen *et al.* zeigte in Mauslungen erhöhte AAM-Zahlen nach 7 - 14 tägiger IAV Infektion (Chen, 2011), welche mit Prozessen zur Eingrenzung der Inflammation, Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase und Wundheilung (Gordon, 2003) assoziiert sind und zeitlich mit der Phase des Abklingens der IAV Infektion übereinstimmen. Obwohl die veränderte frühe Abwehr sekundärer bakterieller Erreger bedingt durch AAM denkbar ist, fehlen dennoch unterstützende Beweise dieser Hypothese (Short, 2012). Das von den AM gebildete, bakteriell induzierte IL-1 β führte zur Sezernierung von GM-CSF, welches auf die AM selbst, aber auch auf pulmonale Makrophagen und Monozyten im

Blutstrom wirken kann. Resultierend daraus kann die Population aktivierter AM erhöht und eine effektive bakterielle Beseitigung eingeleitet werden. Wird die Bildung von IL-1 β und die daraus folgende Sezernierung von GM-CSF durch IAV induziertes Interferon verhindert, sind frühzeitige antibakterielle Immunantworten gestört. Zusammen mit der von Ghoneim *et al.* gezeigten IAV vermittelten frühzeitigen Depletierung von AM (Ghoneim, 2013), wird die Freisetzung von IL-1 β und die daraus resultierende GM-CSF Freisetzung zusätzlich verringert. Interessanterweise führte die Infektion mit *S. pneumoniae* ausschließlich zur Rekrutierung von Makrophagen (LeVine, 1999), wohingegen *S. aureus* sowohl die Rekrutierung vom Makrophagen als auch Neutrophilen auslöste (Subramanian, 2014). Diese Beobachtung deutet auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus von GM-CSF bezüglich verschiedener Stimuli hin.

4.9.2 Unterschiede in der Immunantwort von AECI-ähnlich und AECII

Gelten AECII als immunmodulatorisch aktive Einheit der AEC (Fehrenbach 2001), wird das respiratorische Epithel jedoch flächenmäßig zu etwa 95% von AECI bedeckt (Crapo, 1982), so dass auch diese auf eine anteilige Bildung von GM-CSF getestet wurden. Wie bereits in den AECII löste erst die Stimulation mit IL-1 β die Sekretion von GM-CSF aus den AECI-ähnlich aus, nicht aber die Infektion mit *S. pneumoniae*. Zudem sezernierten beide AEC Typen etwa gleichgroße Mengen an IL-8 nach Stimulation mit IL-1 β . Im Gegensatz zu den AECI-ähnlich bildeten die AECII nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-8, wenn auch schwächer als nach Applikation von IL-1 β .

Die Infektion der AECII mit *S. pneumoniae* D39 induzierte die Freisetzung geringer Mengen an IL-6, während in AECI-ähnlich keine Induktion detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu sezernierten die AECI-ähnlich deutlich mehr IL-6 nach Stimulation mit IL-1 β als AECII. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Daten von Wong *et al.*, welche mit einer FACS basierten Methode zur Zellisolation zeigten, dass AECI mehr IL-6 als AECII nach LPS Stimulus sezernierten (Wong, 2013). Auch die LPS induzierten TNF α - und IL-1 β Antworten der AECI waren stärker als die der AECII (Wong, 2013). Dementgegen konnten in der vorliegenden Studie keine zelltypspezifischen Unterschiede zwischen der IL-1 β Antwort nach *S. pneumoniae* festgestellt werden, jedoch sind die von Wong *et al.* detektieren Zytokinmengen auch in den AECI sehr gering und nahezu übereinstimmend mit der Quantifizierung innerhalb der vorliegenden Arbeit. Da das von Wong *et. al* verwendete LPS kein Bestandteil des grampositiven Bakteriums *S. pneumoniae* ist, können unterschiedliche Beobachtungen durch eine erregerspezifische Immunantwort begründet sein. Im Vergleich zu den mit *S. pneumoniae*

infizierten AM sekretierten beide Populationen von AEC nach Stimulation mit IL-1 β deutlich größere Mengen an IL-6 und IL-8 (Anhang 5). Auch die Gruppe um Thorley *et al.* vermutet, dass die *in vivo* Stimulation mit LPS zur Freisetzung von IL-1 β und TNF α aus Makrophagen führt, welche wiederum die Zytokinfreisetzung aus AEC verursacht (Thorley, 2007). Im Fall von GM-CSF, IL-8 und IL-6 konnte die Hypothese von Thorley *et al.* innerhalb der vorliegenden Studie nachvollzogen werden, da erst nach Zugabe von IL-1 β deren Sekretion erfolgte. Da IL-6 und IL-8 nicht durch die vorhergehende Infektion mit IAV beeinflusst wurden, wird deren Bildung vermutlich durch die bakterielle Infektion redundant vermittelt, beispielsweise über das von der IAV Infektion unbeeinflusste TNF α . Von vielen Zelltypen wird IL-8 infolge eines immunmodulatorischen Stimulus sekretiert, insbesondere durch TNF α und IL-1 β (Matsushima, 1989). Hypothetisch könnte infolge der reduzierten IL-1 β Sekretion weniger IL-8 freigesetzt werden. Insbesondere in Epithelzellen wird jedoch die Bildung von IL-8 primär über eine TNF α verursachte Rekrutierung von NF- κ B zu einem TNF α -Resonse-Element induziert (Chandru, 2007). Die Freisetzung des dafür benötigten TNF α blieb, sowohl im Gewebe als auch in den isolierten AM, unbeeinflusst von der vorhergehenden IAV Infektion. Einhergehend damit war nicht nur im Gesamtlungengewebe eine bereits initial starke Sekretion von IL-8 zu detektieren, sondern auch in den isolierten AEC. Diese konnte pneumokokkenabhängig, aber auch durch die Applikation von IL-1 β , erhöht werden.

4.10 Komplexität sekundärer bakterieller Infektionen

1935 verstarb ein männlicher Patient, der sich von einer IAV Infektion erholte, nach siebentägiger Konvaleszenz an einer sekundären Pneumokokkeninfektion (Andrewes, 1935 beschrieben in McCullers, 2014). Andererseits kann bereits während akuter Phasen der IAV Infektion eine sekundäre bakterielle Infektion auftreten (van der Sluijs, 2010). Resultierend daraus wird bei *in vivo* Versuchen zwischen einer Post-Influenzapneumonie und der kombinierten viralen/bakteriellen Infektion unterschieden (van der Sluijs, 2010). Während bei der Post-Influenzapneumonie die Virusinfektion bereits vor der sekundären Bakterieninfektion abgeklungen ist, erfolgt die Infektion mit dem bakteriellen Erreger in der kombinierten viralen/bakteriellen Infektion spätestens sieben Tage nach Virusgabe. Auch wenn bei der Post-Influenzapneumonie keinerlei virale Partikel mehr nachzuweisen sind, können einige Pathogene nachträgliche Spuren hinterlassen, z. B. in Form epigentischer Fingerabdrücke, welche die Immunantwort des Wirtsorganismus beeinflussen und so eine Sekundärinfektion begünstigen können (Rosseau, 2006). So zeigte die Gruppe um Wang *et al.* in A549-

Zellkulturen, dass IAV die Funktion der DNA-Methyltransferase 3a über eine verstärkte Bildung der mikro-RNA „miR29“ unterdrückten (Wang, J, 2009). Aber auch eine Desensitivierung von TLR Signalen, besonders TLR2, TLR4 und TLR5, mehrere Monate nach Genesung von einer Infektion mit RSV, trug zur Ausbildung sekundärer bakterieller Pneumonien bei (Didierlaurent, 2008). Die Identifikation nachträglicher virusinduzierter Veränderungen des Wirtes kann präventive Therapien IAV infizierter Risikogruppen verbessern und so das Auftreten sekundärer Infektionen minimieren. Erfolgt die bakterielle Sekundärinfektion zu einem früheren Zeitpunkt, an dem noch virale Partikel im Wirt nachweisbar sind, liegt eine kombinierte Infektion beider Erreger vor. In einer an Mäusen durchgeführten Studie von McNamee *et al.* erfolgte die sekundäre bakterielle Infektion drei bis sechs Tage nach Applikation des Virus, was bereits zu Unterschieden innerhalb der ermittelten Parametern führte. Versuchstiere, welche sechs Tage nach IAV zusätzlich mit *S. pneumoniae* infiziert wurden, waren suszeptibler als solche die nach drei Tagen sekundär bakteriell infiziert wurden. Als mögliche Ursache wurde zum einen die Suppression der Neutrophilen und eine davon unabhängige verstärkte Expression bestimmter Zytokine wie IL-10, aber auch TNF α und MCP-1 genannt (McNamee, 2006). Auch die Wahl der Erreger beeinflusst den Ausgang des Infektionsverlaufes. Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts die IV verursachte Mortalität überwiegend durch IAV vom Subtyp H1N1 verursacht wurde, sind seit den 1970er die Todesfälle und das Auftreten sekundärer Pneumonien häufiger mit dem Subtyp H3N2 verbunden (Simonsen, 1997), so dass für die vorliegende Studie der saisonale IAV Stamm Pan/99 vom Subtyp H3N2 verwendet wurde.

Glücklicherweise besitzen nicht alle Erregerkombinationen das gleiche tödliche Potential wie die Kombination aus IAV und *S. pneumoniae*. Beispielsweise gelang es weniger adhäsiven Pneumokokkenstämmen infolge einer Adenovirusinfektion nicht das respiratorische Epithel zu befallen (Håkansson, 1994). Während einer Pneumokokkeninfektion lösen bakterielle Faktoren wie die Polysaccharidkapsel, Pneumolysin (Feldman, 1990; Cockeran, 2001) und auch die H₂O₂ induzierende Pyruvat Oxidase SpxB (Spellerberg, 1996) unterschiedliche inflammatorischen Reaktionen aus. SpxB defiziente Pneumokokken verursachten in Mäusen seltener eine sekundäre bakterielle Pneumonie als SpxB tragende Pneumokokken (McCullers, 2014). Dennoch ist ungeklärt, ob bestimmte bakterielle Pathogenitätsfaktoren generell den Ausbruch bakterieller Superinfektionen begünstigen bzw. dafür erforderlich sind. Hingegen ist bekannt, dass neben den virusinduzierten Interferonen auch andere virale Faktoren zur Erhöhung der bakteriellen Suszeptibilität beitragen, wie z. B. die Neuraminidase durch Spaltung von Sialinsäuren, aber auch das NS1 Protein und PB1-F2 (McCullers, 2014).

Eventuell ist die sich ändernde Sterblichkeitsrate bezüglich der IAV Subtypen in den subtypspezifischen Unterschieden viraler Virulenzfaktoren begründet (Peltola, 2005), welche möglicherweise Ausbrüche sekundärer Infektionen forcieren könnten. Überwiegend wird daher von einer unidirektionalen Förderung der Kopathogenität ausgegangen, bei dem die Virusinfektion den Weg für die bakterielle Kolonisierung vorbereitet. Die Gruppe um Verkaik *et al.* zeigte, dass pneumokokkeninfizierte humane Bronchialepithelzellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Metapneumoviren aufwiesen, welche bei der Infektion mit anderen bakteriellen Erregern nicht auftrat (Verkaik, 2011). Zudem führte *H. influenzae* zur verstärkten Bildung von ICAM-I und TLR-3 auf humanen Atemwegsepithelzellen, die eine nachfolgende Infektion mit Rhinoviren forcierten (Sajjan, 2006). Obwohl es auch zu sekundären Virusinfektionen kommt, ist der Prozentsatz beschriebener Fälle gegenüber der virusvermittelten sekundären Bakterieninfektion bedeutend geringer, so dass die Frage nach einer bidirektionalen Kopathogenität bisher kaum adressiert worden ist.

4.11 Vor- und Nachteile des humanen *ex vivo* Lungenmodells

Die Thematik der virusassoziierten erhöhten Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Sekundärinfektionen wurde experimentell überwiegend in murinen Studien analysiert. Deskriptive Daten aus dem humanen System stammen hauptsächlich von *post mortem* analysiertem Patientenmaterial, die wenigen experimentellen Ansätze aus *in vitro* Versuchen unter der Verwendung immortalisierter Zelllinien. Ermöglicht die Analyse histologischer Proben Beobachtungen bezüglich Schwere und Art der Infektion, liefert sie dennoch keine ausreichende Möglichkeit zur experimentellen Ermittlung mechanistischer Ursachen. In präklinischen Untersuchungen sind Labortierversuche weit verbreitet, wobei je nach adressiertem Forschungsschwerpunkt auf die Nutzbarkeit des jeweiligen Modellsystems geachtet werden muss (Bouvier, 2010). Um medizinisch relevante Ergebnisse zu erhalten, muss das Modelltier dem humanen System bezüglich klinischer Symptome, pathophysiologischer Veränderungen oder wie bei infektiologischen Fragestellungen der Empfänglichkeit gegenüber dem jeweiligen Erreger ähneln (Bouvier, 2010). Für die Untersuchung IAV assoziierter bakterieller Pneumonien hat sich überwiegend das Mausmodell etabliert (McCullers, 2006; Ballinger, 2010). Neben der kostengünstigen und praktikablen Durchführbarkeit, zeichnet sich die Attraktivität dieses Modells durch die Option genetischer Manipulationen in Form transgener Mäuse oder von *Knock-out*- bzw. *Knock-in*-Mäusen aus. Dem ungeachtet steht die Tatsache gegenüber, dass sich das humane und murine System nicht nur anatomisch unterscheiden, sondern auch in zahlreichen Bereichen ihrer angeborenen und adaptiven

Immunität (Irvin, 2003; Mestas, 2004). Im Gegensatz zur humanen Lunge besteht z. B. der rechte Lungenflügel der Maus aus vier Lobi (human: drei) und der linke nur aus einem (human: zwei). Hinzukommend besitzen Mäuse mit 13 - 17 respiratorischen Bronchialgenerationen deutlich weniger als der Mensch (Irvin, 2003). Murine und humane TLR unterscheiden sich partiell nicht nur in ihrer Expression und Funktion voneinander, sondern auch in ihrer Anzahl. Während es in Mäusen zwölf TLR gibt, existieren im Menschen nur zehn (Kumar, 2011; Bryant, 2012). Ähneln sich TLR1 - 9 zwischen Mensch und Maus funktionell weitestgehend, gibt es kein murines Analogon zum humanen TLR10, dafür existieren in der Maus TLR11 - 13 (Kumar, 2011). Weitere gravierende Unterschiede bestehen in der homogenen Genetik und der sterilen lokalen Haltung der Versuchstiere, welche im Menschen definitiv nicht gegeben sind. Doch gerade aufgrund der unterschiedlichen Lebensbedingungen der Patienten sowie deren genetischer Variabilität sind die aus den Lungenproben gewonnenen Resultate sehr robust.

Das Mausmodell ermöglicht die grundlegende Indikation bestimmter Ursachen, ihre Gültigkeit für den menschlichen Organismus ist jedoch nicht immer eindeutig bestätigt. Insbesondere bei der Untersuchung IV bedingter Krankheiten ist zu berücksichtigen, dass die Maus keinen natürlichen Wirtsorganismus der meisten dieser Viren darstellt. Da humanpathogene IAV nur unzureichend in der murinen Lunge replizieren (Weinheimer, 2012), müssen durch wiederholtes Passagieren mausadaptierte Laborstämme generiert werden (Matsuoka, 2009). Zudem sind Wildtypmäuse teilweise nicht empfänglich für die Infektion mit IAV Stämmen, welche in gezüchteten Stämmen von Labormäusen schwere bis tödliche Infektionen verursachen. Ihnen fehlt das „*Myxovirus Resistance*“ Gen, infolge dessen sich nicht über das daraus kodierte „*Myxovirus Resistance I*“ Protein mit seinen antiviralen Funktionen verfügen (Lindenmann 1962; Haller, 1987, Bouvier, 2010). Hinzukommend reagieren einige murine Inzuchtlinien teilweise unterschiedlich auf die Infektion mit dem gleichen IAV bzw. die verschiedenen Laborstämme sind unterschiedlich suszeptibel (Srivastava, 2009), so dass Ergebnisse verschiedener Stämme schwer miteinander vergleichbar sind.

Auch für die Infektion mit *S. pneumoniae* werden überwiegend mausadaptierte Stämme eingesetzt. Wie auch im Menschen verursachen verschiedene Serotypen unterschiedlich ausgeprägte Krankheitsbilder. Dennoch zeigten sich einige klinische Isolate von *S. pneumoniae* in Mäusen hoch virulent, während sie im Menschen kaum krankheitsrelevant waren bzw. andersherum (Briles, 1992 und 2008). Entsprechend der Beobachtungen die aus Infektionen mit IAV stammen (Srivastava, 2009), unterscheidet sich auch die Empfänglichkeit verschiedener Mausstämmen gegenüber einer Pneumokokkeninfektion voneinander (Webster, 1933; Rake, 1936; Gingles, 2011). Darüber hinaus scheint die Applikationsart der Pathogene

berücksichtigt werden zu müssen. Führt die intraperitoneale Applikation von Pneumokokken zum Tod der Mäuse, verlief die intravenöse Applikation im gleichen Mausstamm avirulent (Webster, 1933).

Das *ex vivo* Modell humanen Lungengewebes eignet sich um die in Mäusen gemachten Beobachtungen, welche die Lunge betreffen, sowohl im pulmonalen Gewebeverband als auch auf zellulärer Ebene auf Gültigkeit im humanen System zu überprüfen. Dennoch ermöglicht es derzeit keine systemischen Untersuchungen, da weder die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blutstrom noch eine Interaktion mit anderen Organen erfolgen kann. Zudem unterbleibt die Neubildung von Zellen innerhalb regenerativer und anderer physiologischer Prozesse. Zusätzlich wird das Modell bislang durch die fehlende Sauerstoffzufuhr und Zirkulation des Mediums, zur effektiven Versorgung mit Nährstoffen, limitiert. Mehrwöchige Versuchsabläufe, wie sie in Mäusen zur Analyse der Post-Influenzapneumonie gemacht wurden, sind experimentell daher bisher in humanen Lungengewebekulturen nicht umsetzbar. Entgegen natürlich verlaufender Infektionen des Respirationstrakts werden die Erreger im humanen Lungenmodell direkt mit dem Medium zu den entsprechenden Zielzellen transportiert. Infizieren saisonale IAV vornehmlich den oberen Respirationstrakt und gelangen nur bei einem schweren Infektionsverlauf in den unteren, werden hier sofort Zellen des respiratorischen, alveolären Epithels adressiert. Innovative Versuchsansätze streben an, verschiedene Organe anhand ihrer strukturell kleinsten Einheit nachzubilden, diese auf Mikrochips aufzubringen und sie über Elektroden sowie artifizielle Zirkulationssysteme miteinander interagieren zu lassen. Derartige Versuchsmodelle ermöglichen es, das menschliche System langfristig in seiner Komplexität zu untersuchen (Marx, 2012). Auch das interdisziplinäre *Tissue Engineering*, die Gewebezucht ganzer Organe bzw. Organteile, welches im Rahmen von Organversagen/ -verlust und der begrenzten Verfügbarkeit an Spenderorganen neue Therapiestrategien eröffnet, dient Forschern als experimentelle Modellgrundlage. Primäres Ziel ist die Konstruktion eines komplexen lebenden Gewebeersatzes, bestehend aus biologischen oder synthetischen Polymeren und im Idealfall autologen Zellen, welcher in den Patienten transplantiert werden kann. Die 3D-Struktur der Lunge ist sehr komplex, so dass für die Generierung der Lungenmatrix neben aufwendig experimentell designten Polymerkomplexen auch allo- oder xenogene Spenderlungen eingesetzt werden, welche dezellularisiert und anschließend rezellularisiert werden müssen (Kubo, 2012). Die Rezellularisierung der pulmonalen Matrix stellt eine weitere Herausforderung dar, da in der Lunge mehr als 40 verschiedene Zelltypen zu finden sind und die Verfügbarkeit von Stamm- und Vorläuferzellen sowie deren Fähigkeit zur Proliferation und

Differenzierung *in vitro* begrenzt ist (Kubo, 2012). Darüber hinaus entfällt für die experimentelle Forschung die Integration in ein bestehendes lebendes Nährstoffnetz, so dass die Versorgung mit Nähr- und Sauerstoff auch hier methodisch bedacht werden muss (Kannan, 2005). Unter anderem wird versucht über Computerprogramme Gefäßsysteme aus Polymerkonstrukten zu generieren, welche die Perfusion und Versorgung mit Blut simulieren (Kannan, 2005).

Im Rahmen eines SFB-TR84 Transferprojektes (TF 1) gibt es zudem Optimierungsansätze, welche das in der Studie verwendete pulmonale Gewebe direkt adressieren. Um die Versorgung des Gewebes mit Nähr- und Sauerstoff zu verbessern, sollen mittels einer Hochdruckwasserstrahltechnik planparallele Lungenschnitte erstellt werden, welche in Relation zur ihrer geringen Schnittdicke eine große Oberfläche aufweisen. Zusätzlich minimiert dieses Verfahren die mechanische Belastung des Gewebes durch Pinzetten und Skalpelle während der manuellen Präparation, mit dem Ziel nichtinfektionsbedingte inflammatorische Prozesse zu verringern. Kombiniert mit einer Ventilation der Organkulturen wird der zelluläre Erhalt des Gewebes verbessert. Im Rahmen dieses Vorhabens wird zudem eine Untersuchungskammer für die Intravitalmikroskopie etabliert, welche neben Temperatur und Begasung, die Perfusion des Gewebes mit Medium gewährleistet und folglich eine längere Kultivierungsdauer ermöglicht. Im Rahmen der Post-Influenzapneumonie könnten so auch später auftretende Effekte untersucht werden.

4.12 Ausblick

Um zu überprüfen, ob die Suppression von IL-1 β und GM-CSF interferonvermittelt erfolgt, wurde eine Kombination von IFN β + IFN γ in die Lungenkulturen appliziert. Einen weiteren wichtigen Schritt zur Verifizierung dieser Hypothese stellt die Funktionsverlustanalyse dar. Durch die Unterbindung der Wirkung bzw. der Freisetzung von Interferonen sollte demnach die pneumokokkeninduzierte Sekretion von IL-1 β und GM-CSF infolge einer vorhergehenden Infektion mit IAV nicht mehr unterdrückt werden. Sowohl Typ I (IFN β) und Typ II Interferone (IFN γ) waren in den humanen Lungenkulturen an der Suppression von IL-1 β beteiligt, doch auch die Beteiligung von Typ III Interferonen an diesem Effekt kann nicht ausgeschlossen werden. Resultierend daraus und auch im Hinblick auf die zahlreichen Subtypen der Interferone ergibt sich die Problematik die Neutralisierung aller Interferontypen samt ihrer Subformen zu realisieren. Die Inhibition der Interferonrezeptoren mittels neutralisierender Antikörper ist dabei praktikabler als die der einzelnen Interferone selbst, da jeder Interferontyp inklusive

seiner Subtypen jeweils über einen spezifischen Rezeptor vermittelt (Samuel, 2007). Dennoch gestaltet sich die praktische Umsetzung innerhalb des Lungengewebes schwierig. Neben der erfolgreichen Infektion beider Erreger, Pan/99(H3N2) und *S. pneumoniae* D39, müssen zusätzlich auch die neutralisierenden Antikörper das Gewebe vollständig durchdringen und wirken. Infolge einer unvollständigen Neutralisierung finden die interferonvermittelten Effekte weiterhin statt, in welchem Ausmaß bleibt ungewiss. Die pathophysiologisch benötigte minimale Menge an Interferonen zur Suppression von IL-1 β ist unbekannt, daher kann nur durch die vollständige Blockade der Rezeptoren eine Aussage über die Beteiligung der Interferone an den beobachteten Effekten getroffen werden. Denkbar wäre es, den Überstand von mit Pan/99(H3N2) infizierten Lungenproben auf AM zu transferieren, welche vorab mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Interferonrezeptoren behandelt wurden. Auch hier muss die vollständige Neutralisierung erfolgen, jedoch entfällt bei einer Zellkultur die Problematik des kompletten Durchdringens der injizierten Lösung eines dreidimensionalen Gewebes. Durch die separate Neutralisierung der einzelnen Interferonrezeptoren innerhalb der Koinfektion kann zudem der direkte Anteil des jeweiligen Interferontyps auf die Suppression der *S. pneumoniae* induzierten IL-1 β bzw. GM-CSF Freisetzung quantifiziert werden.

Eine Inhibition der Interferonantwort kann auch durch die Stilllegung der interferonkodierenden Gene bzw. die der verschiedenen Interferonrezeptoren erfolgen. Eine prokaryotische RNA-basierte Form der Immunabwehr, welche als „*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) – CRISPR associated proteins (Cas)*“ System bezeichnet wird, stellt eine praktikable Methode zur gezielten Veränderung von DNA dar. Dieser von Bakterien und Archaeen übernommene adaptive Abwehrmechanismus, dient ihnen zum Schutz gegenüber viralen Infektionen (Al-Attara, 2011). Während einer Virusinfektion fragmentieren die Cas-Proteine die virale DNA. Anschließend werden die kleinen viralen DNA-Fragmente als Spacer zwischen die kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen eines CRISPR Abschnittes eingefügt. Die CRISPR-DNA wird zu crRNA (CRISPR RNA) transkribiert, über welche virale DNA bei einer erneuten Infektion schnell erkannt und über die Cas-Proteine zerstört werden kann (Bhaya, 2011). Durch die Umfunktionierung des Cas9 Proteins von *S. pyogenes* kann sequenzspezifisch ein Doppelstrangbruch in jede beliebige DNA-Sequenz inseriert werden, mit dem Ziel neue Gene einzufügen oder zu deletieren bzw. auszuschalten. Mittels dieses Systems könnten die einzelnen Interferonrezeptoren gänzlich ausgeschaltet werden, um so den Anteil der Interferonantwort bzw. der einzelnen Interferontypen infolge einer Pan/99(H3N2) Infektion auf die sekundäre Pneumokokkeninfektion nachzuvollziehen.

In der vorliegenden Arbeit waren AM maßgeblich an der Sezernierung von IL-1 β beteiligt. Durch die Eliminierung der AM kann die Hypothese der IL-1 β regulierten Freisetzung von GM-CSF überprüft und der Anteil dieser Zellen an der Freisetzung von IL-1 β im humanem Lungengewebe bestimmt werden. Für *in vivo* Versuche werden dazu Clodronatliposomen verwendet, welche von den AM phagozytiert werden. Das Clodronat ist nicht in der Lage die Phospholipiddoppelhülle von Liposomen und Zellmembranen passiv zu durchwandern, so dass nur phagozytierende Zellen die Liposomen aktiv aufnehmen können. Die Phospholipasen der Makrophagen zerstören die Phospholipiddoppelhülle der Liposomen und setzen so das Clodronat im Makrophagen frei, welches sich intrazellulär ansammelt und bei einer zureichenden Schwellenkonzentration zur Schädigung und Apoptose der Makrophagen führt (van Rooijen, 1996). Theoretisch sollte die Applikation von Clodronatliposomen in *ex vivo* kultivierten Lungengewebeproben, welche anschließend mit *S. pneumoniae* D39 infiziert werden, die Freisetzung von IL-1 β verhindern, so dass aus diesen Gewebestücken auch kein GM-CSF sezerniert werden kann. Erst die direkte Stimulation dieser Lungenstücke mit IL-1 β würde demnach zur Freisetzung von GM-CSF führen. Voraussetzend dafür sind sowohl die ausschließliche bzw. überwiegende Sezernierung von IL-1 β aus AM als auch die Vernachlässigbarkeit anderer als IL-1 β Produzenten bekannter Zelltypen in diesem System. Der Hypothese nach sollte jedoch eine Verringerung der Induktion von IL-1 β und rückwirkend auch von GM-CSF- zu beobachten sein.

Literaturverzeichnis

Gesamt: 347 Quellen

Al-Attar, S; Westra, ER; van der Oost, J; Brouns, SJ. "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes." *Biol Chem*. 2011; 392 (4):277-289.

Albright, FS; Orlando, P; Pavia, AT; Jackson, GG; Cannon Albright, LA. "Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza." *J Infect Dis*. 2008 197:18e24.

Allen, IC; Scull, MA; Moore, CB; Holl, EK; McElvania-TeKippe, E; Taxman, DJ; Guthrie, EH; Pickles, RJ; Ting, JP. "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." *Immunity*. 2009; 30(4):556-65.

Alymova, IV; Portner, A; Takimoto, T; Boyd, KL; Babu, YS; McCullers, JA. "The novel parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX2798 prevents lethal synergism between a paramyxovirus and *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49:398–405.

Akagawa, KS; Kamoshita, K; Tokunaga, T. "Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages." *J Immunol*. 1988; 141:3383-3390.

Aman, MJ; Keller, U; Derigs G; Mohamadzadeh M; Huber, C; Peschel, C. "Regulation of cytokine expression by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells: inhibition of hemaopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist." *Blood*. 1994; 84(12):4142-50.

Andreeva, AV; Kutuzov, MA; Voyno-Yasenetskaya, TA. "Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2007; 293(2):L259-271.

Andrew, PW; Mitchell, TJ; Morgan, PJ. "Relationship of structure to function in pneumolysin." *Microb Drug Resist*. 1997; 3:11–7.

Ank, N; Iversen, MB; Bartholdy, C; Staeheli, P; Hartmann, R; Jensen, UB; Dagnaes-Hansen, F; Thomsen, AR; Chen, Z; Haugen, H, *et al*. "An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity." *J Immunol*. 2008; 180:2474–2485.

Anto, RJ; Mukhopadhyay, A; Shishodia, S; Gairola, CG; Aggarwal, BB. "Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B α : correlation with induction of cyclooxygenase-2." *Carcinogenesis*. 2002; 23(9):1511–1518.

Armitage, JO. "Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood*. 1998; 92:4491-4508.

- Armstrong, L; Medford, AR; Uppington, KM; Robertson, J; Witherden, IR; Tetley, TD; Millar, AB. "Expression of Functional Toll-Like Receptor-2 and -4 on Alveolar Epithelial Cells." *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31(2):241-5.
- Avadhanula, V; Rodriguez, CA; DeVincenzo, JP; Wang, Y; Webby, RJ; Ulett, GC; Adderson, EE. "Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner." *J. Virol*. 2006; 80:1629–1636.
- Ballinger, MN; Standiford, TJ. "Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry." *J Interferon Cytokine Res*. 2010; 30(9):643-52.
- Bauer, RN; Brighton, LE; Mueller, L; Xiang, Z; Rager, JE; Fry, RC; Peden, DB; Jaspers, I. "Influenza enhances caspase-1 in bronchial epithelial cells from asthmatic volunteers and is associated with pathogenesis." *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130(4):958-67.e14.
- Beck-Schimmer, B; Schwendener, R; Pasch, T; Reyes, L; Booy, C; Schimmer, RC. "Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury." *Respir Res*. 2005; 6:61-74.
- Benne, CA; Benaissa-Trouw, B; van Strijp, JA; Kraaijeveld, CA; van Iwaarden, JF. "Surfactant protein A, but not surfactant protein D, is an opsonin for influenza A virus phagocytosis by rat alveolar macrophages." *Eur J Immunol*. 1997; 27(4):886-90.
- Bergeron, Y; Ouellet, N; Deslauriers, AM; Simard, M; Olivier, M; Bergeron, MG. "Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice." *Infect. Immun*. 1998; 66:912–922.
- Beutler, B. "Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling." *Nature*. 2004; 430:257–263.
- Bhaskaran, M; Kolliputi, N; Wang, Y; Gou, D; Chintagari, NR; Liu, L. "Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway." *J Biol Chem*. 2007; 282(6):3968-76.
- Bhaya, D; Davison, M; Barrangou, R. "CRISPR Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation." *Annu Rev Genet*. 2011; 45:273-297.
- Bisno, AL; Griffin, JP; Van Epps, KA; Niell, HB; Rytel, MW. "Pneumonia and Hong Kong influenza: a prospective study of the 1968–1969 epidemic." *Am. J. Med. Sci*. 1971; 261:251–263.
- Black, RA; Kronheim, SR; Cantrell, M; Deeley, MC; March, CJ; Prickett, KS; Wignall, J; Conlon, PJ; Cosman, D; Hopp, TP; Mochizuki, DY. "Generation of biologically active interleukin-1b by proteolytic cleavage of the inactive precursor." *J Biol Chem*. 1988; 263:9437-9442.
- Bogaert, D.; De Groot, R.; Hermans, P.W. "Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease." *Lancet Infect. Dis*. 2004 4(3): 144–154.
- Bommas-Ebert, U; Teubner, P, Voß, R. „Kurzlehrbuch der Anatomie und Embryologie.“ *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 2011; 3. Auflage.

- Bonfield, TL, Raychaudhuri, B; Malur, A; Abraham, S; Trapnell, BC; Kavuru, MS; Thomassen, MJ. "PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 285(5):L1132-6.
- Borok Z; Lubman RL; Danto SI; Zhang XL; Zabski SM; King LS; Lee DM; Agre P; Crandall ED. "Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5." *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 18(4):554-61.
- Bösch, D; Steffel, J (Hrsg.); Luscher, T (Hrsg.). "Lunge und Atemwege." *Springer Medizin Verlag*. 2014; 1. Auflage:1-4.
- Boss, JM. "Regulation of transcription of MHC class II genes." *Curr Opin Immunol*. 1997; 9(1):107-13.
- Bouvier, NM; Lowen, AC. "Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission." *Viruses*. 2010; 2(8):1530-1563.
- Bridy-Pappas, AE; Margolis, MB; Center, KJ; Isaacman, DJ. "Streptococcus pneumoniae: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention." *Pharmacotherapy*. 2005; 25:1193–1212.
- Briles, DE; Crain, MJ; Gray, BM; Forman, C; Yother, J. "Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of Streptococcus pneumoniae." *Infect Immun*. 1992; 60:111-116.
- Briles, DE; Hollingshead, SK; Jónsdóttir, I. "Animal models of invasive pneumococcal disease." p. 47-58. In Siber, GR; Klugman, KP; Mäkelä, PH. (ed.), *Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine*. ASM Press, Washington, DC.
- Broug-Holub, E; Toews, GB; van Iwaarden, JF; Strieter, RM; Kunkel, SL; Paine, RI; Standiford, TJ. "Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defences in murine Klebsiella pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival." *Infect Immun*. 1997; 65:1139-1146.
- Brundage, JF; Shanks, GD. "What really happened during the 1918 influenza pandemic? The importance of bacterial secondary infections." *J. Infect. Dis*. 2007; 196:1717–1718.
- Bryant, CE; Monie, TP. "Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity." *Open Biol*. 2012; 2(4):120015.
- Brydon, EW; Smith, H; Sweet, C. "Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release." *J Gen Virol*. 2003; 84(9):2389-400.
- Burgess, AW; Metcalf, D. "Serum half-life and organ distribution of radiolabeled colony stimulating factor in mice." *Exp Hematol*. 1977; 5:456-464.
- Bustin, SA. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol*. 2000; 25(2):169-93.

- Cakarova, L; Marsh, LM; Wilhelm, J; Mayer, K; Grimminger, F; Seeger, W; Lohmeyer, J; Herold, S. "Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair." *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(6):521-32.
- Cardullo, RA; Alm, EJ. "Introduction to image processing." *Methods Cell Biol*. 1998; 56:91-115.
- Celli, BR; Locantore, N; Yates, J; Tal-Singer, R; Miller, BE; Bakke, P; Calverley, P; Coxson, H; Crim, C; Edwards, LD; Lomas, DA; Duvoix, A; MacNee, W; Rennard, S; Silverman, E; Vestbo, J; Wouters, E; Agustí, A. "Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(10):1065-72.
- Chandru, H; Boggaram, V. "The role of sphingosine 1- phosphate in the TNF- α induction of IL-8 gene expression in lung epithelial cells." *Gene*. 2007; 391(1-2):150–160.
- Charu, V; Chowell, G; Palacio Mejia, LS; Echevarría-Zuno, S; Borja-Aburto, VH; Simonsen, L; Miller, MA; Viboud, C. "Mortality burden of the A/H1N1 pandemic in Mexico: a comparison of deaths and years of life lost to seasonal influenza." *Clin. Infect. Dis*. 2011; 53:985–993.
- Chen, CC; Sun, YT; Chen, JJ; Chiu, KT. "TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway." *J Immunol*. 2000; 165(5):2719-28.
- Chen, CJ; Kono, H; Golenbock, D; Reed, G; Akira, S; Rock, KL. "Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells." *Nat Med*. 2007; 13:851–856.
- Chen, WH; Toapanta, FR; Shirey K,A; Zhang, L; Giannelou, A; Page, C; Frieman, MB; Vogel, SN; Cross, AS. "Potential role for alternatively activated macrophages in the secondary bacterial infection during recovery from influenza." *Immunol. Lett*. 2011; 141(2):227–234.
- Chodosh, J; Astley, RA; Butler, MG; Kennedy, RC. "Adenovirus keratitis: a role for interleukin-8." *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 41(3):783-9.
- Chow, JC. Young, DW; Golenbock, DT; Christ, WJ; Gusovsky, F. "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." *J Biol Chem*. 1999 274(16):10689-92.
- Chowell, G; Bertozzi, SM; Colchero MA; Lopez-Gatell, H; Alpuche-Aranda, C; Hernandez, M; *et al*. "Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza." *N Engl J Med*. 2009; 361:674–679.
- Chujor, CS; Klein, L; Lam, C. "Selective inhibition of interleukin-1 beta expression in activated RAW 264.7 macrophages by interferon-gamma." *Eur J Immunol*. 1996; 26(6):1253-9.

- Cockeran, R; Theron, AJ; Steel, HC; Matlola, NM; Mitchell, TJ; Feldman, C; Anderson, R. "Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils." *J Infect Dis.* 2001; 15;183(4):604-11.
- Conenello, GM; Palese, P. "Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch." *Cell Host Microbe.* 2007; 2:207e209.
- Crane, J; Wallace, CA; Forrester, JV. "Regulation of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Retinal Pigment Epithelial Cells by IL-1 β and IFN γ ." *Cell Immunol.* 2001; 209(2):132-9.
- Crapo, JD; Barry, BE, *et al.* "Cell number and cell characteristics of the normal human lung." *The American review of respiratory disease.* 1982; 126(2):332-337.
- Cundell, DR; Gerard, NP; Gerard, C; Idanpaan-Heikkila, I; Tuomanen, EI. "Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor." *Nature.* 1995; 377:435–438.
- Cunningham, AC; Milne, DS; Wilkes, J; Dark, JH; Tetley, TD; Kirby, JA. "Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings." *J Cell Sci.* 1994; 107 (Pt 2):443-9.
- Dallaire, F; Ouellet, N; Bergeron, Y; Turmel, V; Gauthier, MC; Simard, M; Bergeron, MG. "Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia." *J. Infect. Dis.* 2001; 184:292–300.
- Davis, MJ; Tsang, TM; Qiu, Y; Dayrit, JK; Freij, JB; Huffnagle, GB; Olszewski, MA. "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to change in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection." *mBio.* 2013; 4(3):e00264- 13.
- Dawood, FS; Iuliano, AD; Reed, C; Meltzer, M; *et al.* "Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study." *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12:687–695.
- De Bentzmann, S; Plotkowski, C; Puchelle, E. "Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium." *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154:S155–S162.
- De Boer, ML; Hu, J; Kalvakolanu, DV; Hasday, JD; Cross, AS. "IFN-gamma inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta in primary murine macrophages via a Stat1-dependent pathway." *J Interferon Cytokine Res.* 2001; 21(7):485-94.
- Dessing, MC; van der Sluijs, KF; Florquin, S; Akira, S; van der Poll, T. "Toll-like receptor 2 does not contribute to host response during postinfluenza pneumococcal pneumonia." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 36:609-614.
- Dessing, MC; Florquin, S; Paton, JC; van der Poll, T. "Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci." *Cell Microbiol.* 2008; 10:237-246.

- Didierlaurent, A; Goulding, J; Patel, S; Snelgrove, R; Low, L; Bebien, M; Lawrence, T; van Rijt, LS; Lambrecht, BN; Sirard, JC; Hussell, T. "Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection." *J Exp Med*. 2008; 205:323-329.
- Dinarello, CA. "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood*. 1996; 87(6): 2095–147.
- Dinarello, CA. "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family" *Ann Rev Immunol*. 2009; 27:519-550.
- Dinarello, CA. "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." *Blood*. 2011; 117:3720–3732.
- Di Padova, F; Pozzi, C; Tondre, MJ; Tritapepe, R. "Selective and early increase of IL-1 inhibitors, IL-6 and cortisol after elective surgery." *Clin Exp Immunol*. 1991; 85(1):137-42.
- Dobbs, LG; Williams, MC; Brandt, AE. "Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture." *Biochim Biophys Acta*. 1985; 846(1):155-66.
- Dobbs, LG. Gonzalez, R; Matthay, MA; Carter, EP; Allen, L; Verkman, AS. "Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(6):2991-6.
- Doherty, PC; Turner, SJ; Webby, RG; Thomas, PG. "Influenza and the challenge for immunology." *Nat Immunol*. 2006; 7(5):449-55.
- Drake, JW. "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(9):4171-4175.
- Dranoff, G; Crawford, AD; Sadelain, M; Ream, B; Rashid, A; Bronson, RT; Dickersin, GR; Bachurski, CJ; Mark, EL; Whitsett, JA. "Involvement of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in pulmonary homeostasis." *Science*. 1994; 264:713–716.
- Dugan, VG; Chen, R; Spiro, DJ; Sengamalay, N; Zaborsky, J; Ghedin, E; Nolting, J; Swayne, DE; Runstadler, JA; Happ, GM; Senne, DA; Wang, R; Slemons, RD; Holmes, EC; Taubenberger, JK. "The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds." *PLoS Pathog*. 2008; 4:e1000076.
- Eigenbrod, T; Bode, KA; Dalpke, AH. "Early inhibition of IL-1 β expression by IFN- γ is mediated by impaired binding of NF- κ B to the IL-1 β promoter but is independent of nitric oxide." *J Immunol*. 2013; 190(12):6533-41.
- Elbert, KJ; Schäfer, UF; Schäfers, HJ; Kim, KJ; Lee, VH; Lehr, CM. "Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies." *Pharm Res*. 1999; 16(5):601-8.
- Estenssoro, E; Ríos, FG; Apezteguía, C; Reina, R; Neira, J; *et al*. "Pandemic 2009 influenza A in Argentina: a study of 337 patients on mechanical ventilation." *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2010; 182:41–48.

- Everitt, AR; Clare, S; Pertel, T; John, SP; Wash, RS; Smith, SE; Chin, CR; Feeley, EM; Sims, JS; Adams, DJ; Wise, HM; Kane, L; Goulding, D; Digard, P; Anttila, V; Baillie, JK; Walsh, TS; Hume, DA; Palotie, A; Xue, Y; Colonna, V; Tyler-Smith, C; Dunning, J; Gordon, SB; Smyth, RL; Openshaw, PJ; Dougan, G; Brass, AL; Kellam, P: "IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza." *Nature*. 2012; 484:519e523.
- Fagon, JY; Chastre, J; Hance, AJ; Montravers, P; Novara, A; Gibert, C. "Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay." *Am J Med*. 1993; 94(3):281-8.
- Fang, R; Tsuchiya, K; Kawamura, I; Shen, Y; Hara, H; Sakai, S; Yamamoto, T; Fernandes-Alnemri, T; Yang, R; Hernandez-Cuellar, E; Dewamitta, SR.; Xu, Y; Qu, H; Alnemri, ES; Mitsuyama, M. "Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection." *J Immunol*. 2011; 187(9):4890-9.
- Fatkhova, D; Rabes, A; Machnik, C; Guruprasad, K; Pache, F; Berg, J; Toennies, M; Bauer, TT; Schneider, P; Schimek, M; Eggeling, S; Mitchell, TJ; Mitchell, AM; Hilker, R; Hain, T; Suttorp, N; Hippenstiel, S; Hocke, AC; Opitz, B. "Serotype 1 and 8 *Pneumococci* Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue." *PLoS One*. 2015; 10(8):e0137108.
- Fehrenbach, H; Kasper, M; Tscherning, T; Pan, T; Schuh, D; Shannon, JM; Müller, M; Masson, RJ. "Keratinocyte growth factor- induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis." *Eur. Respir. J*. 1999; 14:534-544.
- Fehrenbach, H. "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respiratory research*. 2001; 2(1):33-46.
- Feldman, C; Mitchell, TJ; Andrew, PW; Boulnois, GJ; Read, RC; Todd, HC; Cole, PJ; Wilson, R. "The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro." *Microb Pathog*. 1990; 9(4):275-84.
- Fenton, MJ; Vermeulen, MW; Kim, S; Burdick, M; Strieter, RM; Kornfeld, H. "Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun*. 1997; 65(12):5149-56.
- Figueiredo, F; Koerner, TJ; Adams, DO. "Molecular mechanisms regulating the expression of class II histocompatibility molecules on macrophages. Effects of inductive and suppressive signals on gene transcription." *J Immunol*. 1989; 143(11):3781-6.
- Finkelstein, JC; Johnston, T; Barrett, OG. "Particulate-Cell Interactions and Pulmonary Cytokine Expression." *Environm Health Perspect*. 1997; 105: 1179-1182.
- Fleetwood, AJ; Cook, AD; Hamilton, JA. "Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Crit Rev Immunol*. 2005; 25:405-428.
- Fleming-Dutra, KE; Taylor, T; Link-Gelles, R; Garg, S; Jhung, MA; Finelli, L; Jain, S; Shay, D; Chaves, SS; Baumbach, J; Hancock, EB; Beall, B; Bennett, N; Zansky, S; Petit, S; Yousey-Hindes, K; Farley, MM; Gershman, K; Harrison, LH; Ryan, P; Lexau, C; Lynfield, R; Reingold,

- A; Schaffner, W; Thomas, A; Moore, MR. "Effect of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic on invasive pneumococcal pneumonia." *J Infect Dis*. 2013; 207(7):1135-43.
- Francis, TE; de Torregrosa, MV. "Combined infection of mice with H. influenzae and influenza virus by the intranasal route." *J. Infect. Dis*. 1945; 76:70-77.
- Fuchs, S; Hollins, AJ; Laue, M; Schaefer, UF; Roemer, K; Gumbleton, M; Lehr, CM. "Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C." *Cell Tissue Res*. 2003; 311(1):31-45.
- Gabay, C; Lamacchia, C; Palmer, G. "IL-1 pathways in inflammation and human diseases." *Nature Rev Rheumatol*. 2010; 6:232-241.
- Gajewska, BU; Wiley, RE; Jordana, M. "GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003; 2:279-292.
- Garcia-Robles I; Akarsu, H; Müller, CW; Ruigrok, RW; Baudin, F. "Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes." *Virology*. 2005; 332(1):329-36.
- Garlanda, C; Dinarello, CA; Mantovani, A. "The Interleukin-1 family: back to the future." *Immunity*. 2013; 39(6):1003-1018.
- Gasson, JC. "Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood*. 1991; 77(6):1131-1145.
- Gaunt, ER; Harvala, H; McIntyre, C; Templeton, KE; Simmonds, P. "Disease burden of the most commonly detected respiratory viruses in hospitalized patients calculated using the disability adjusted life year (DALY) model." *J Clin Virol*. 2011; 52:215e221.
- Ghoneim, HE; Thomas, PG; McCullers, JA. "Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections." *J Immunol*. 2013; 191(3):1250-9.
- Ghosh, S; Gregory, D; Smith, A; Kobzik, L. "MARCO regulates early inflammatory responses against influenza: a useful macrophage function with adverse outcome." *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45(5):1036-44.
- Gibbert, K; Joedicke, JJ; Meryk, A; Trilling, M; Francois, S; Duppach, J; Kraft, A; Lang, KS; Dittmer, U. "Interferon-alpha subtype 11 activates NK cells and enables control of retroviral infection." *PLoS Pathog*. 2012; 8(8):e1002868.
- Gilbert, RJ; Jimenez, JL; Chen, S; Tickle, IJ; Rossjohn, J; Parker, M; Andrew, PW; Saibil, HR. "Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*." *Cell*. 1999; 97:647-55.
- Gill JR; Sheng, ZM; Ely, SF; Guinee, DG; Beasley, MB; Suh, J; Deshpande, C; Mollura, DJ; Morens, DM; Bray, M; Travis, WD; Taubenberger, JK. "Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections." *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134:235e243.

- Gingles, NA; Alexander, JE; Kadioglu, A. "Role of genetic resistance in invasive pneumococcal infection: Identification and study of susceptibility and resistance in inbred mouse strains." *Infect. Immun.* 2001; 69:426-434.
- Giroux, M; Descoteaux, A. "Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: modulation by protein kinase C- α ." *J Immunol.* 2000; 165(7):3985-91.
- Glezen, WP; Decker, M; Perrotta, DM. „Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981." *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:550-555.
- Glezen, WP. "Asthma, influenza, and vaccination." *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118:1199-1206.
- Göllner, G; Aman, MJ; Steffens, HP; Huber, C; Peschel, C; Derigs, HG. "Interferon- α (IFN- α) inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) expression at the post-transcriptional level in murine bone marrow stromal cells." *Br J Haematol.* 1995; 91(1):8-14.
- Gordon, S. "Alternative activation of macrophages." *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(1):23–35.
- Gordon, S, Taylor, PR. "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev. Immunol.* 2005; 5:953-964.
- Grabowska, K; Höberg, L; Penttinen, P; Svensson, A; Ekdahl, K. "Occurrence of invasive pneumococcal disease and number of excess cases due to influenza." *BMC Infect Dis.* 2006; 6:58.
- Graham, MB; Dalton, DK; Giltinan, D; Braciale, VL; Stewart, TA; Braciale, TJ. "Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene." *J Exp Med.* 1993; 178(5):1725-32.
- Grubek-Jaworska, H; Paplińska, M; Hermanowicz-Salamon, J; Białek-Gosk, K; Dąbrowska, M; Grabczak, E; Domagała-Kulawik, J; Stępień, J; Chazan, R. "IL-6 and IL-13 in induced sputum of COPD and asthma patients: correlation with respiratory tests." *Respiration.* 2012; 84(2):101-7.
- Gu, Y; Kuida, K; Tsutsui, H; Ku, G; Hsiao, K; Fleming, MA; Hayashi, N; Higashino, K; Okamura, H; Nakanishi, K; *et al.* "Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme." *Science.* 1997; 275:206–209.
- Guarda, G; Braun, M; Staehli, F; Tardivel, A; Mattmann, C; Förster, I; Farlik, M; Decker, T; Du Pasquier, RA; Romero, P; Tschopp, J. "Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation." *Immunity.* 2011; 34(2):213-23.
- Guarner, J; Falcón-Escobedo, R. "Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1, and H3N2 influenza viruses." *Arch Med Res.* 2009 40(8):655-61.
- Guillot, L; Le Goffic, R; Bloch, S; Escriou, N; Akira, S; Chignard, M; Si-Tahar, M. "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus." *J Biol Chem.* 2005; 280(7):5571-5580.

- Håkansson, A; Kidd, A; Wadell, G; Sabharwal, H; Svanborg, C. "Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*." *Infect Immun*. 1994; 62(7):2707-14.
- Haller, O. Acklin, M; Staeheli, P. "Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies." *J Interferon Res*. 1987; 7(5):647-56.
- Hamilton, JA; Stanley, ER; Burgess, AW; Shadduck, RK. "Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors." *J. Cell. Physiol*. 1980; 103:435–445.
- Hamilton, J.A.; Anderson, GP. "GM-CSF Biology." *Growth Factors*. 2004; 22:225-231.
- Hamilton, JA. "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(7):533-44.
- Harford, CG; Leidler, V; Hara, M. "Effect of the lesion due to influenza virus on the resistance of mice to inhaled pneumococci." *J. Exp. Med*. 1949; 89:53–67.
- Harford, CG; Hara, M. "Pulmonary edema in influenzal pneumonia of the mouse and the relation of fluid in the lung to the inception of pneumococcal pneumonia." *J. Exp. Med*. 1950; 91:245–259.
- Hartshorn, KL. "Role of surfactant protein A and D (SP-A and SP-D) in human antiviral host defense." *Front Biosci* (Schol Ed). 2010; 2:527-46.
- Hauschildt, S; Kleine, B. "Bacterial stimulators of macrophages." *Int Rev Cytol*. 1995; 161:263-331.
- Hawgood, S; Clements, JA. "Pulmonary surfactant and its apoproteins." *J Clin Invest*. 1990; 86(1):1–6.
- Hayashida, H; Toh, H; Kikuno, R; Miyata, T. "Evolution of influenza virus genes." *Mol Biol Evol*. 1985; 2(4):289-303.
- Heid, CA; Stevens, J; Livak, KJ; Williams, PM. "Real time quantitative PCR." *Genome Res*. 1996; 6(10):986-94.
- Herold, S; Hoegner, K; Vadász, I; Gessler, T; Wilhelm, J; Mayer, K; Morty, RE; Walmrath, HD; Seeger, W; Lohmeyer, J. "Inhaled Granulocyte/Macrophage Colony–Stimulating Factor as Treatment of Pneumonia-associated Acute Respiratory Distress Syndrome." *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 189(5):609-11.
- Hocke, AC; Becher, A; Knepper, J; Peter, A; Holland, G; Tönnies, M; Bauer, TT; Schneider, P; Neudecker, J; Muth, D; Wendtner, CM; Rückert, JC; Drosten, C; Gruber, AD; Laue, M; Suttorp, N; Hippenstiel, S; Wolff, T. "Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs." *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188(7):882-6.

- Högner, K; Wolff, T; Pleschka, S; Plog, S; Gruber, AD; Kalinke, U; Walmrath, HD; Bodner, J; Gattenlöhner, S; Lewe-Schlosser, P; Matrosovich, M; Seeger, W; Lohmeyer, J; Herold, S. “Macrophage-expressed IFN- β contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia.” *PLoS Pathog.* 2013; 9(2):e1003188.
- Holland, PM; Abramson, RD; Watson, R; Gelfand, DH. “Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(16):7276-80.
- Huang, CH; Chen, CJ; Yen, CT; Yu, CP; Huang, PN; Kuo, R.L.; Lin, SJ; Chang, CK; Shih, SR. “Caspase-1 deficient mice are more susceptible to influenza A virus infection with PA variation.” *J Infect Dis.* 2013; 208(11):1898-905.
- Huang, FF; Barnes, PF; Feng, Y; Donis, R; Chroneos, ZC; Idell, S; Allen, T; Perez, DR; Whitsett, JA; Dunussi-Joannopoulos, K; Shams, H. “GM-CSF in the lung protects against lethal influenza infection.” *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184:259-268.
- Huang H; Li H; Zhou P; Ju D. “Protective effects of recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor on H1N1 influenza virus-induced pneumonia in mice.” *Cytokine.* 2010; 51:151-157.
- Huffman-Reed, JA; Rice, WR; Zsengeller, ZK; Wert, SE; Dranoff, G; Whitsett, JA. “GM-CSF enhances lung growth and causes alveolar type II epithelial cell hyperplasia in transgenic mice.” *Am J Physiol.* 1997; 273:L715-L725.
- Irvin, CG; Bates, JH. “Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size.” *Respir Res.* 2003; 4:4.
- Isaacs, A, Lindermann, J. “Virus interference. I. The interferon.” *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1957; 147, 258–267.
- Iverson, AR; Boyd, KL; McAuley, JL; Plano, LR; Hart, ME; McCullers, JA. “Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia from *Staphylococcus aureus*.” *J Infect Dis.* 2011; 203(6):880–888.
- Izurieta, HS; Thompson, WW; Kramarz, P; *et al.* “Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children.” *N Engl J Med.* 2000; 342:232-239.
- Jagger, BW; Wise, HM; Kash, JC; Walters, KA; Wills, NM; Xiao, YL; Dunfee, RL; Schwartzman, LM; Ozinsky, A; Bell, GL; Dalton, RM; Lo, A; Efstathiou, S; Atkins, JF; Firth, AE; Taubenberger, JK; Digard, P. “An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response.” *Science.* 2012; 337:199e204.
- Jaguin, M; Houlbert, N; Fardel, O; Lecureur, V. “Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin.” *Cell Immunol.* 2013; 281(1):51-61.
- Jakab, GJ. “Mechanisms of virus-induced bacterial superinfections of the lung.” *Clin Chest Med.* 1981; 2:59–66.
- Jefferies, JM; Johnston, CH; Kirkham, LA; Cowan, GJ; Ross, KS; Smith, A; Clarke, SC; Brueggemann, AB; George, RC; Pichon, B; Pluschke, G; Pfluger, V; Mitchell, TJ. “Presence

of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks.” *J Infect Dis.* 2007; 196(6):936-44.

Joosten, LA; Netea, MG; Fantuzzi, G; Koenders, M; Helsen, MM; Sparrer, H; Pham, CT; van der Meer, JW; Dinarello, CA; van den Berg, WB. “Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin- 1beta.” *Arthritis Rheum.* 2009; 60(12):3651–62.

Julkunen, I; Sareneva, T; Pirhonen, J; Ronni, T; Melen, K; Matikainen, S. “Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression.” *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12:171–180.

Kadioglu, A; Weiser, JN; Paton, JC; Andrew, PW. “The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease.” *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(4):288-301.

Kafka, D; Ling, E; Feldman, G; Benharroch, D; Voronov, E; Givon-Lavi, N; Iwakura, Y; Dagan, R; Apte, RN; Mizrahi-Nebenzahl, Y. “Contribution of IL-1 to resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection.” *Int Immunol.* 2008; 20(9):1139-46.

Kalinski, P. “Regulation of immune responses by prostaglandin E2.” *J Immunol.* 2012; 188(1):21-8.

Kannan, RY; Salacinski, HJ; Sales, K; Butler, P; Seifalian, AM. “The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review.” *Biomaterials.* 2005; 26(14):1857-75.

Karpurapu, M; Wang, X; Deng, J; Park, H; Xiao, L; Sadikot, RT; Frey, RS; Maus, UA; Park, GY; Scott, EW; Christman, JW. “Functional PU.1 in macrophages has a pivotal role in NF-κB activation and neutrophilic lung inflammation during endotoxemia.” *Blood.* 2011; 118(19):5255-66.

Kash, JC; Taubenberger, JK. “The Role of viral, host and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis.” *Am J Pathol.* 2015; 185(6):1528-36.

Killip, MJ; Fodor, E; Randall, RE. “Influenza virus activation of the interferon system.” *Virus Res.* 2015; pii: S0168-1702(15)00056-8.

King, QO; Lei, B; Harmsen, AG. “Pneumococcal surface protein A contributes to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection after influenza virus infection.” *J Infect Dis.* 2009; 200:537-545.

Knapp, S; Leemans, JC; Florquin, S; Branger, J; Maris, NA; Pater, J; van Rooijen, N; van der Poll, T. “Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia.” *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:171-179.

Knapp, S; Schultz, MJ; van der Poll, T. “Pneumonia models and innate immunity to respiratory bacterial pathogens.” *Shock.* 2005; 24(Suppl. 1):12–18.

- Koedel, U; Rupprecht, T; Angele, B; Heesemann, J; Wagner, H; Pfister, HW; Kirschning, CJ. "MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS." *Brain*. 2004; 127:1437–1445.
- Kooguchi, K; Hashimoto, S; Kobayashi, A; Kitamura, Y; Kudoh, I; Wiener-Kronish, J; Sawa, T. "Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." *Infect Immun*. 1998; 66:3164-3169.
- Krausgruber, T; Blazek, K; Smallie, T; Alzabin, S; Lockstone, H; Sahgal, N; Hussell, T; Feldmann, M; Udalova, IA. "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nat Immunol*. 2011; 12(3):231-8.
- Kubo, H. "Tissue engineering for pulmonary diseases: Insights from the laboratory." *Respirology*. 2012; 17(3):445-54.
- Kukavica-Ibrulj, I; Hamelin, ME; Prince, GA; Gagnon, C; Bergeron, Y; Bergeron, MG; Boivin, G. "Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia." *J. Virol*. 2009; 83:1341–1349.
- Kumagai, Y; Takeuchi, O; Kato, H; Kumar, H; Matsui, K; Morii, E; Aozasa, K; Kawai, T; Akira, S. "Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses." *Immunity*. 2007; 27(2):240-52.
- Kumar, H; Kawai, T; Akira, S. "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol*. 2011; 30(1):16-34.
- Lacey, DC; Achuthan, A; Fleetwood, AJ; Dinh, H; Roiniotis, J; Scholz, GM; Chang, MW; Beckman, SK; Cook, AD; Hamilton, JA. "Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models." *J Immunol*. 2012; 188(11):5752-65.
- Laemmli, UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.
- Laennec, RTH. "Translation of selected passages from *De l'Auscultation Mediate*." *Williams Wood & Co.*, New York 1923; 88–95.
- Landsman, L; Jung, S. "Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages." *J Immunol*. 2007; 179:3488-3494.
- Le Bon, A; Tough, DF. "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon." *Curr Opin Immunol*. 2002; 4: 432-6.
- Lee, CJ; Banks, SD; Li, JP. "Virulence, Immunity, and Vaccine Related to *Streptococcus pneumoniae*." *Crit Rev Microbiol*. 1991; 18(2):89-114.
- LeVine, AM; Reed, JA; Kurak, KE; Cianciolo, E; Whitsett, JA. "GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection." *J Clin Invest*. 1999; 103:563-569.
- LeVine, AM; Koenigsnecht, V; Stark, JM. "Decreased pulmonary clearance of *S. pneumoniae* following influenza A infection in mice." *J Virol Methods*. 2001; 94:173–186.

- Li, A; Varney, ML; Valasek, J; Godfrey, M; Dave, BJ; Singh, RK. "Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP- 2 production and angiogenesis." *Angiogenesis*. 2005; 8(1):63–71.
- Li, L; Sherry, B. "IFN- α expression and antiviral effects are subtype and cell type specific in the cardiac response to viral infection." *Virology*. 2010; 396(1):59-68.
- Li, W; Moltedo, B; Moran, TM. "Type I Interferon Induction during Influenza Virus Infection Increases Susceptibility to Secondary Streptococcus pneumoniae Infection by Negative Regulation of $\gamma\delta$ T Cells." *J. Virol*. 2012; 86(22):12304-12312.
- Lindenmann, J. "Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus." *Virology*. 1962; 16:203-4.
- Linß, W; Fanghänel, J. "Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie." *Walter de Gruyter GmbH&Co*, Berlin 1998.
- Loosli, CG; Stinson, SF; Ryan, DP; Hertweck, MS; Hardy, JD; Serebrin, R. "The destruction of type 2 pneumocytes by airborne influenza PR8-A virus; its effect on surfactant and lecithin content of the pneumonic lesions of mice." *Chest*. 1975; 67:7S–14S.
- Lopez-Castejon G; Brough, D. "Understanding the mechanism of IL-1b secretion." *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22(4):189-95.
- Louria, D; Blumenfeld, H; Ellis, J; Kilbourne, ED; Rogers, D. "Studies on influenza in the pandemic of 1957–58. II. Pulmonary complications of influenza." *J. Clin. Investig*. 1959; 38:213–265.
- Lowen, AC; Mubareka, S; Tumpey, TM; Garcia-Sastre, A; Palese, P. "The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses." *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:9988–9992.
- Ludwig, S; Planz, O; Pleschka, S; Wolff, T. "Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?" *Cell - Trends Mol Med*. 2003; 9(2):46-52.
- Lund, JM; Alexopoulou, L; Sato, A; Karow, M; Adams, NC; Gale, NW; Iwasaki, A; Flavell, RA. "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:5598–5603.
- Lynch, JP; Zhanel, GG. "Streptococcus pneumoniae. Epidemiology, Risk Factors, and Strategies for Prevention." *Semin Respir Crit Care Med*. 2009; 30(2):189-209.
- Mach, B; Steimle, V; Martinez-Soria, E; Reith, W. "Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease." *Annu Rev Immunol*. 1996; 14:301-31.
- MacMicking, J; Xie, QW; Nathan, C. "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:323-50.
- Madin, SH; Darby, Jr, NB. "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* .1958; 98(3):574-576.

Mallia, P; Johnston, SL: "Influenza infection and COPD." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007; 2:55-64.

Mamelund, SE. "A socially neutral disease? Individual social class, household wealth and mortality from Spanish influenza in two socially contrasting parishes in Kristiania 1918–19." *Soc Sci Med* .2006; 62:923–40.

Manicassamy, B; Manicassamy, S; Belicha-Villanueva, A; Pisanelli, G; Pulendran, B; García-Sastre, A. "Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus." *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(25):11531-6.

Marini, M; Vittori, E; Hollemborg, J; Mattoli, S. "Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma." *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 89(5):1001-9.

Marriott, HM; Gascoyne, KA; Gowda, R; Geary, I; Nicklin, MJH; Iannelli, F; Pozzi, G; Mitchell, TJ; Whyte, MKB.; Sabroe, I; Dockrell, DH. "Interleukin-1 β Regulates CXCL8 Release and Influences Disease Outcome in Response to *Streptococcus pneumoniae*, Defining Intercellular Cooperation between Pulmonary Epithelial Cells and Macrophages." *Infect Immun*. 2012; 80(3):1140–1149.

Martin, CM; Kunin, CM; Gottlieb, LS; Finland, M. "Asian influenza A in Boston, 1957–1958. II. Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza." *AMA. Arch. Intern. Med*. 1959; 103:532–542.

Martinez, FO; Gordon, S; Locati, M; Mantovani, A. "Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression." *J Immunol*. 2006; 177(10):7303-11.

Marx, U; Walles, H; Hoffmann, S; Lindner, G; Horland, R; Sonntag, F; Klotzbach, U; Sakharov, D; Tonevitsky, A; Lauster, R. " 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man?" *Altern Lab Anim*. 2012; 40(5):235-57.

Masters, SL; Mielke, LA; Cornish, AL; Sutton, CE; O'Donnell, J; Cengia, LH; Roberts, AW; Wicks, IP; Mills, KH; Croker, BA. "Regulation of interleukin-1 β by interferon- γ is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production." *EMBO Rep*. 2010; 11:640–646.

Matsuoka, Y; Lamirande, EW; Subbarao, K. "The mouse model for influenza." *Curr Protoc Microbiol*. 2009; Chapter 15:Unit 15G.3.

Matsushima, K; Oppenheim, JJ. "Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF," *Cytokine*. 1989; 1(1):2–13.

McCullers, JA; Webster, RG. "A mouse model of dual infection with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*, In Options for the control of influenza IV." Elsevier Science B.V., 2001; p:601–607. Amsterdam, The Netherlands.

- McCullers, JA; Reh, JE. "Lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor." *J. Infect. Dis.* 2002; 186:341–350.
- McCullers, JA.; Bartmess, KC. "Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae." *J. Infect. Dis.* 2003; 187:1000–1009.
- McCullers, JA. "Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus." *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(3):571–582.
- McCullers, JA. "The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung." *Nat Rev Microbiol.* 2014; 4:252-62.
- McGill, J; Heusel, JW; Legge, KL. "Innate immune control and regulation of influenza virus infections." *J Leukoc Biol.* 2009; 86:803–812.
- McNamee, LA; Harmsen, AG. "Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary Streptococcus pneumoniae infection." *Infect Immun.* 2006; 74(12):6707-21.
- Medzhitov, R; Janeway, C Jr. "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." *Immunol Rev.* 2000a; 173:89-97.
- Medzhitov, R; Janeway, C Jr. "Innate immunity." *N Engl J Med.* 2000b; 343(5):338-44.
- Mestas, J; Hughes, CC. "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol.* 2004; 172(5):2731-8.
- Metersky, ML; Masterton, RG; Lode, H; File, TM Jr; Babinchak, T. "Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza." *Int J Infect Dis.* 2012; 16(5):e321-31.
- Metzger, DW.; Sun, K. "Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza." *J Immunol.* 2013; 191(5):2047-52.
- Mizgerd, JP. "Respiratory Infection and the Impact of Pulmonary Immunity on Lung Health and Disease." *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186(9):824–829.
- Molina-Holgado, E.; Ortiz, S.; Molina-Holgado, F.; Guaza, C. "Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes." *Br J Pharmacol.* 2000; 131(1):152-9.
- Monroe, KM; McWhirter, SM; Vance, RE. "Induction of type I interferons by bacteria." *Cell Microbiol.* 2010; 12(7):881-90.
- Morens, DM; Fauci, AS. "The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century." *J Infect Dis.* 2007; 195:1018–28.
- Morens, DM; Taubenberger, JK; Fauci, AS. "Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness." *J. Infect. Dis.* 2008 198:962–970.

- Morens, DM; Taubenberger, JK. "Pandemic influenza: certain uncertainties." *Rev. Med. Virol.* 2011; 21:262–284.
- Morgenroth, K. "Das Surfactantsystem der Lunge. Morphologische Grundlagen und Klinische Bedeutung." *Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co* 1986.
- Mosser, DM; Edwards, JP. "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(12):958–969.
- Muir, R; Wilson, GH. "Influenza and its complications." *Br. Med. J.* 1919; m i:3–5.
- Muñoz-Planillo, R; Kuffa, P; Martínez-Colón, G; Smith, BL; Rajendiran, TM; Núñez, G. "K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter." *Immunity.* 2013; 38(6):1142-53.
- Murugan, V; Peck, MJ. "Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease." *Exp Lung Res.* 2009; 35(6):439-85.
- Nelson, S; Mason, CM; Kolls, J; Summer, WR. "Pathophysiology of pneumonia." *Clin Chest Med.* 1995; 16(1):1-12.
- Netter, FH. "Farbatlant der Medizin. Band 4: Atmungsorgane." *Georg Thieme Verlag Stuttgart.* 1982.
- Neuzil, KM; Reed, GW; Mitchel, EF; Simonsen, L; Griffin, MR. "Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women." *Am J Epidemiol.* 1998; 148:1094-102.
- N'Guessan, PD; Hippenstiel, S; Etouem, MO; Zahlten J; Beermann, W; Lindner, D; Opitz, B; Witzenrath, M; Rosseau, S; Suttorp, N; Schmeck, B. "Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290(6): L1131-8.
- O Nualláin, EM; Puri, P; Reen, DJ. "Early induction of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in infants and children undergoing surgery." *Clin Exp Immunol.* 1993; 93(2):218-22.
- Paine, R 3rd; Wilcoxon, SE; Morris, SB; Sartori, C; Baleeiro, CE; Matthay, MA; Christensen, PJ. "Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury." *Am J Pathol.* 2003; 163(6):2397-406.
- Paine, R; Standiford, TJ; Dechert, RE; Moss, M; Martin, GS; Rosenberg, AL; Thannickal, VJ; Burnham, EL; Brown, MB; Hyzy, RC. "A randomized trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for patients with acute lung injury*." *Critical Care Medicine.* 2012; 40:90-97.
- Palese, P; Shaw, ML. "Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication." Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2007; pp:1647e1690.
- PAP-guide. (2015). Outline of clinical features from <http://www.pap-guide.jp/en/first/index.html>

- Peltola, VT; Rehg, JE; McCullers, JA. "A ferret model of synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*." *Int. Congr. Ser.* 2004; 1263C:486–490.
- Peltola, VT; Murti, KG; McCullers, JA. "Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia." *J. Infect. Dis.* 2005; 192:249–257.
- Peltola, VT; Heikkinen, T; Ruuskanen, O; Jartti, T; Hovi, T; Kilpi, T; Vainionpää, R. "Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children." *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30:456–461.
- Pestka, S; Langer, JA; Zoon, KC; Samuel, CE. "Interferons and their actions." *Annu Rev Biochem.* 1987; 56:727-77.
- Phipps, RP; Stein, SH; Roper, RL. "A new view of prostaglandin E regulation of the immune response." *Immunol Today.* 1991; 12(10):349-52.
- Pittet, LA; Hall-Stoodley, L; Rutkowski, MR; Harmsen, AG. "Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42(4):450–460.
- Platanias, LC. "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(5):375-86.
- Pletz, MWR. „Ambulant erworbene Pneumonie - Häufige Erreger und Antibiotikaresistenz.“ *Pneumologie.* 2005; 2:17-27.
- Pletz, MWR; von Baum, H; van der Linden, M; Rohde, G; Schütte, H; Suttorp, N; Welte, T. "The burden of pneumococcal pneumonia - experience of the German competence network CAPNETZ." *Pneumologie.* 2012; 66(8):470-5.
- Plotkowski, MC; Puchelle, E; Beck, G; Jacquot, J; Hannoun, C. "Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus." *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; 134:1040–1044.
- Plotkowski, MC; Bajolet-Laudinat, O; Puchelle, E. "Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa." *Eur. Respir. J.* 1993; 6:903–916.
- Potter, CW. "Chronicle of influenza pandemics." 1998; p:3–18. In K. G. Nicholson, R. G. Webster, and A. J. Hay (ed.), *Textbook of influenza.* Blackwell Scientific Publications, London, United Kingdom.
- Punatar, AD; Kusne, S; Blair, JE; Seville, MT. Vikram, HR. "Opportunistic infections in patients with pulmonary alveolar proteinosis." *J Infect.* 2012; 65(2):173-9.
- Puren, AJ; Fantuzzi, G; Dinarello, CA. "Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 β are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells." *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(5):2256-61.
- Rajan, S; Saiman, L. "Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis." *Semin Respir Infect.* 2002; 17:47-56.

- Rake, G. "Pathology of pneumococcus infection in mice following intranasal instillation." *J. Exp. Med.* 1936; 36:17-31.
- Rathinam, VA; Vanaja, SK; Fitzgerald, KA. "Regulation of inflammasome signaling." *Nat Immunol.* 2012; 13(4):333-42.
- Reed, JA; Ikegami, M; Robb, L; Begley, CG; Ross, G; Whitsett, JA. "Distinct changes in pulmonary surfactant homeostasis in common beta-chain- and GM-CSF-deficient mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278:L1164-L1171.
- Rey-Giraud, F. Hafner, M; Ries, CH. "In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions." *PLoS One.* 2012; 7(8):e42656.
- Rider, P; Carmi, Y; Guttman, O; Braiman, A; Cohen, I; Voronov, E; White, MR; Dinarello, CA; Apte, RN. "IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation." *J Immunol.* 2011; 187:4835-4843.
- RKI 2013/ 38 "Epidemiologisches Bulletin" from https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/38_13.pdf?__blob=publicationFile.
- Robinson, KM; Clay, M; McHugh, KJ; Mandalapu, S; Alcorn, JF. "The Role Of Interferon Lambda In Protection Against Staphylococcus Aureus Infection." *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:A6149.
- Rocha Neto, OG; Leite, RF; Baldi, BG. "Update on viral community-acquired pneumonia." *Rev Assoc Med Bras.* 2013; 59(1):78-84. Review.
- Rollwagen, FM; Davis, TA; Li, YY; Pacheco, ND; Zhu, XL. "Orally administered IL-6 induces elevated intestinal GM-CSF gene expression and splenic CFU-GM." *Cytokine.* 2004; 27(4-5):107-12.
- Rosseau, S. Selhorst, J; Wiechmann, K; Leissner, K; Maus, U; Mayer, K; Grimminger, F; Seeger, W; Lohmeyer, J. "Monocyte Migration Through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines." *J Immunol.* 2000; 164:427-435.
- Rosseau, S; Hocke, A; Mollenkopf, H; Schmeck, B; Suttorp, N; Kaufmann, SH; Zerrahn, J. "Comparative transcriptional profiling of the lung reveals shared and distinct features of Streptococcus pneumoniae and influenza A virus infection." *Immunology.* 2006; 120(3):380-91.
- Rothberg, MB; Haessler, SD; Brown, RB. "Complications of viral influenza." *Am J Med.* 2008; 121(4):258-64.
- Ruuskanen, O; Lahti, E; Jennings, LC; Murdoch, DR. "Viral pneumonia." *Lancet.* 2011; 377:1264-75.
- Sajjan, US; Jia, Y; Newcomb, DC; Bentley, JK; Lukacs, NW; LiPuma, JJ; Hershenson, MB. "H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression." *FASEB J.* 2006; 20(12):2121-3.

- Samuel, CE. "Innate immunity minireview series: making biochemical sense of nucleic acid sensors that trigger antiviral innate immunity: Interferons, Interferon Receptors, Signal Transducer and Transcriptional Activators, and Interferon Regulatory Factors." *J Biol Chem*. 2007; 282(21):15313-4.
- Schjetne, KW; Thompson, KM; Nilsen, N; Flo, TH; Fleckenstein, B; Iversen, JG; Espevik, T; Bogen, B. "Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target." *J Immunol*. 2003; 171(1):32-36.
- Schoenborn, JR; Wilson, CB. "Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses." *Adv Immunol*. 2007; 96:41-101.
- Scholtissek, C; Rohde, W; Von Hoyningen V; Rott R. "On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2." *Virology*. 1978; 87(1):13-20.
- Schrauwen, EJ; de Graaf, M; Herfst, S; Rimmelzwaan, GF. Osterhaus, AD; Fouchier, RA. "Determinants of virulence of influenza A virus." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(4):479-90.
- Schroder, K; Tschopp, J. "The inflammasomes." *Cell*. 2010; 140(6):821-32.
- Sever-Chroneos, Z; Murthy, A; Davis, J; Florence, JM; Kurdowska, A; Krupa, A; Tichelaar, JW; White, MR; Hartshorn, KL; Kobzik, L; Whitsett, JA; Chroneos, ZC. "GM-CSF modulates pulmonary resistance to influenza A infection." *Antiviral Res*. 2011; 92(2):319-28.
- Seymour, JF; Lieschke, GJ; Grail, D; Quilici, C; Hodgson, G; Dunn, AR. "Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival." *Blood*. 1997; 90(8):3037-49.
- Shahangian, A; Chow, EK; Tian, X; Kang, JR; Ghaffari, A; Liu, SY; Belperio, JA; Cheng, G; Deng, JC. "Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice." *J. Clin. Invest*. 2009; 119:1910–1920.
- Sheridan, JW; Metcalf, D. "A low molecular weight factor in lung-conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation in vitro." *J Cell Physiol*. 1973; 81:11-23.
- Shibata, Y; Berclaz, PY; Chroneos, ZC; Yoshida, M; Whitsett, JA; Trapnell, BC. "GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1." *Immunity*. 2001; 15:557–567.
- Shieh, WJ, Blau DM; Denison, AM; Deleon-Carnes, M; Adem, P; Bhatnagar, J; Sumner, J; Liu, L; Patel, M; Batten, B; Greer, P; Jones, T; Smith, C; Bartlett, J; Montague, J; White, E; Rollin, D; Gao, R; Seales, C; Jost, H; Metcalfe, M; Goldsmith, CS; Humphrey, C; Schmitz, A; Drew, C; Paddock, C; Uyeki, TM; Zaki, SR. "2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States." *Am. J. Pathol*. 2010; 177:166–175.

- Shoma, S; Tsuchiya, K; Kawamura, I; Nomura, T; Hara, H; Uchiyama, R; Daim, S; Mitsuyama, M. "Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation." *Infect Immun*. 2008; 76(4):1547-57.
- Short, KR; Habets, MN; Hermans, PW; Diavatopoulos, DA. "Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship?" *Future Microbiol*. 2012; 7(5):609-24.
- Sibille, Y; Reynolds, HY. "Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury." *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141(2):471-501.
- Simonsen, L; Clarke, MJ; Williamson, GD; Stroup, DF; Arden, NH; Schonberger, LB. "The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index." *Am. J. Public Health*. 1997; 87:1944-1950.
- Sims, JE; Smith, DE. "The IL-1 family: regulators of immunity." *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:89-102.
- Sing, A; Merlin, T; Knopf, HP; Nielsen, PJ; Loppnow, H; Galanos, C; Freudenberg, MA. "Bacterial induction of beta interferon in mice is a function of the lipopolysaccharide component." *Infect Immun*. 2000; 68(3):1600-7.
- Singer, II; Scott, S; Hall, GL; Limjoco, G; Chin, J; Schmidt, JA. "Interleukin-1b is localized in the cytoplasmic grou.
- Sommereyns, C; Paul, S; Staeheli, P; Michiels, T. "IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo." *PLoS Pathog*. 2008; 4:e1000017.
- Song, JY; Nahm, MH; Cheong, HJ; Kim, WJ. "Impact of Preceding Flu-Like Illness on the Serotype Distribution of Pneumococcal Pneumonia." *PLoS One*. 2014; 9(4):e93477.
- Spellerberg, B; Cundell, DR; Sandros, J; Pearce, BJ; Idanpaan-Heikkila, I; Rosenow, C; Masure, HR. "Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*." *Mol Microbiol*. 1996; 19(4):803-13.
- Srivastava, B; Błazejewska, P; Hessmann, M; Bruder, D; Geffers, R; Mael, S; Gruber, AD; Schughart, K. "Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections." *PLoS One*. 2009; 4(3):e4857.
- Standiford, LR; Standiford, TJ; Newstead, MJ; Zeng, X; Ballinger, MN; Kovach, MA; Reka, AK; Bhan, U. "TLR4-dependent GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 302(5):L447-54.
- Standiford, TJ; Kunkel, SL; Basha, MA; Chensue, SW; Lynch, JP 3rd; Toews, GB; Westwick, J; Strieter, RM. "Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung." *J Clin Invest*. 1990; 86(6):1945-53.
- Standiford, TJ; Strieter, RM; Greenberger, MJ; Kunkel, SL. "Expression and regulation of chemokines in acute bacterial pneumonia." *Biol Signals*. 1996; 5(4):203-8.

- Stanley, E; Lieschke, GJ; Grail, D; Metcalf, D; Hodgson, G; Gall, JA; *et al.* “Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology.” *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:5592-5596.
- Stark, JM; Stark, MA; Colasurdo, GN; LeVine, AM. “Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection.” *J. Med. Virol.* 2006; 78:829–838.
- Stegemann, S; Dahlberg, S; Kroger, A; Gereke, M; Bruder, D; Henriques-Normark, B; Gunzer, M. “Increased susceptibility for superinfection with *Streptococcus pneumoniae* during influenza virus infection is not caused by TLR7-mediated lymphopenia.” *PLoS One*. 2009; 4:e4840.
- Steinwede, K; Tempelhof, O; Bolte, K; Maus, R; Bohling, J; Ueberberg, B; Länger, F; Christman, JW; Paton, JC; Ask, K; Maharaj, S; Kolb, M; Gauldie, J; Welte, T; Maus, UA. “Local delivery of GM-CSF protects mice from lethal pneumococcal pneumonia.” *J Immunol*. 2011; 187(10):5346-56.
- Stohr, K. “Preventing and treating influenza.” *Br. Med. J.* 2003; 326:1223– 1224.
- Strunk, R; Eidlen, D; Mason, R. “Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways.” *J Clin Invest*. 1988; 81:1419-1426.
- Subramaniam, R; Barnes, PF; Fletcher, K; Boggaram, V; Hillberry, Z; Neuenschwander, P; Shams, H. “Protecting against post-influenza bacterial pneumonia by increasing phagocyte recruitment and ROS production.” *J Infect Dis*. 2014; 209(11):1827-36.
- Subramaniam, R; Hillberry, Z; Chen, H; Feng, Y; Fletcher, K; Neuenschwander, P; Shams, H. “Delivery of GM-CSF to Protect against Influenza Pneumonia.” *PLoS One*. 2015; 10:e0124593.
- Sun, K; Metzger, DW. “Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection.” *Nat Med*. 2008; 14:558–564.
- Sutejo, R; Yeo, DS; Myaing, MZ; Hui, C; Xia, J; Ko, D; Cheung, PC; Tan, BH, Sugrue, RJ. “Activation of type I and III interferon signalling pathways occurs in lung epithelial cells infected with low pathogenic avian influenza viruses.” *PLoS One*. 2012; 7(3):e33732.
- Suter, U; Welcher, AA; Ozcelik, T; Snipes, GJ; Kosaras, B; Francke, U; Billings-Gagliardi, S; Sidman, RL; Shooter, EM. “Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene.” *Nature*. 1992; 356 (6366):241–244.
- Szubin, R; Chang, WL; Greasby, T; Beckett, L; Baumgarth, N. “Rigid interferon-alpha subtype responses of human plasmacytoid dendritic cells.” *J Interferon Cytokine Res*. 2008; 28(12):749-63.
- Szymanski, KV; Toennies, M; Becher, A; Fatykhova, D; N'Guessan, PD; Gutbier, B; Klauschen, F; Neuschaefer-Rube, F; Schneider, P; Rueckert, J; Neudecker, J; Bauer, TT;

Dalhoff, K; Drömann D; Gruber, AD; Kershaw, O; Temmesfeld-Wollbrueck, B; Suttorp, N; Hippenstiel, S; Hocke, AC. "Streptococcus pneumoniae-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue." *Eur Respir J*. 2012; 40(6):1458-67.

Takeuchi, O; Akira, S. "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell*. 2010; 140(6):805-820.

Tashiro, M; Ciborowski, P; Reinacher, M; Pulverer, G; Klenk, HD; Rott, R. "Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity." *Virology*. 1987; 157:421–430.

Taubenberger, JK; Morens, DM. "The Pathology of Influenza Virus Infections." *Annu Rev Pathol*. 2008; 3:499-522.

Techasaensiri, B; Techasaensiri, C; Mejías, A; McCracken, GH Jr; Ramilo, O. "Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease." *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2010; 29:519–523.

Thomas, PG; Dash, P; Aldridge Jr, JR; Ellebedy, AH; Reynolds, C; Funk, AJ; Martin, WJ; Lamkanfi, M; Webby, RJ; Boyd, KL; *et al*. "The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1." *Immunity*. 2009; 30:566–575.

Thorley, AJ; Ford, PA; Giembycz, MA.; Goldstraw, P; Young, A; Tetley, TD. "Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages." *J Immunol*. 2007; 178(1):463-73.

Thornberry, NA; Bull, HG; Calaycay, JR; Chapman, KT; Howard, AD; Kostura, MJ; Miller, DK; Molineaux, SM; Weidner, JR; Aunins, J; *et al*. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature*. 1992; 356(6372):768-74.

Tong, HH; Fisher, LM; Kosunick, GM; DeMaria, TF. "Effect of adenovirus type 1 and influenza A virus on Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization and otitis media in the chinchilla." *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 2000; 109:1021–1027.

Tong, S; Zhu, X; Li, Y; Shi, M; Zhang, J; Bourgeois, M; Yang, H; Chen, X; Recuenco, S; Gomez, J; Chen, LM; Johnson, A; Tao, Y; Dreyfus, C; Yu, W; McBride, R; Carney, PJ; Gilbert, AT; Chang, J; Guo, Z; Davis, CT; Paulson, JC; Stevens, J; Rupprecht, CE; Holmes, EC; Wilson, IA; Donis, RO. "New world bats harbor diverse influenza A viruses." *PLoS Pathog*. 2013; 9(10):e1003657.

Trotter, Y Jr; Dunn, FL; Drachman, RH; Henderson, DA; Pizzi, M; Langmuir, AD. "Asian influenza in the United States, 1957–1958." *Am. J. Hyg*. 1959; 70:34–50.

Tsuzaki, M; Guyton, G; Garrett, W; Archambault, JM; Herzog, W; Almekinders, L; Bynum, D; Yang, X; Banes, AJ. "IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells." *J Orthop Res*. 2003; 21(2):256-64.

Uchida, K; Nakata, K; Trapnell, BC; Terakawa, T; Hamano, E; Mikami, A; *et al*. "High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis.” *Blood*. 2004; 103:1089-1098.

Unkel, B; Hoegner, K; Clausen, BE; Lewe-Schlosser, P; Bodner, J; Gattenloehner, S; Janßen, H; Seeger, W; Lohmeyer, J; Herold, S. „Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia.” *J Clin Invest*. 2012; 122(10):3652-64.

van der Sluijs, KF; van Elden LJ; Nijhuis, M; Schuurman, R; Pater, JM; Florquin, S; Goldman, M; Jansen, HM; Lutter, R; van der Poll, T. “IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection.” *J Immunol*. 2004; 172:7603-7609

van der Sluijs, KF; van Elden, LJ; Nijhuis, M; Schuurman, R; Florquin, S; Shimizu, T; Ishii, S; Jansen, HM; Lutter, R; van der Poll, T. “Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia.” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290: L194-L199.

van der Sluijs, KF; van der Poll, T; Lutter, R; Juffermans, NP; Schultz, MJ. “Bench-to-bedside review: Bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications.” *Crit Care*. 2010; 14(2):219.

van Pesch, V; Lanaya, H; Renauld, JC; Michiels, T “Characterization of the Murine Alpha Interferon Gene Family.” *J Virol*. 2004; 78(15):8219-28.

Van Rooijen, N; Sanders, A; Van den Berg, T. “Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of drugs.” *J. Immunol. Meth*. 1996; 193: 93-99.

Verkaik, NJ; Nguyen, DT; de Vogel, CP; Moll, HA; Verbrugh, HA; Jaddoe, VW; Hofman, A; van Wamel, WJ; van den Hoogen, BG; Buijs-Offerman, RM; Ludlow, M; de Witte, L; Osterhaus, AD; van Belkum A; de Swart RL. “*Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection.” *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(12):1840-4.

Vissers, M; Remijn, T; Oosting, M; de Jong, DJ; Diavatopoulos, DA; Hermans, PW; Ferwerda, G. “Respiratory syncytial virus infection augments NOD2 signaling in an IFN- β -dependent manner in human primary cells.” *Eur. J. Immunol*. 2012; 42:2727–2735.

Vogels, MT; Eling, WM; Otten, A; van der Meer, JW. “Interleukin-1 (IL-1)-induced resistance to bacterial infection: role of the type I IL-1 receptor.” *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(8):1744-7.

Wang, J; Barke, RA; Charboneau, R; Schwendener, R; Roy, S. “Morphine Induces Defects in Early Response of Alveolar Macrophages to *Streptococcus pneumoniae* by Modulating TLR9-NF- κ B Signaling.” *J Immunol*. 2008; 180:3594-3600.

Wang, J; Oberley-Deegan, R; Wang, S; Nikrad, M; Funk, CJ; Hartshorn, KL; Mason, RJ. “Differentiated human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN- λ 1) in response to influenza A infection.” *J Immunol*. 2009; 182(3):1296-304.

- Wang, Z; Zhang, A; Wan, Y; Liu, X; Qiu, C; Xi, X; Ren, Y; Wang, J; Dong, Y; Bao, M; Li, L; Zhou, M; Yuan, S; Sun, J; Zhu, Z; Chen, L; Li, Q; Zhang, Z; Zhang, X; Lu, S; Doherty, PC; Kedzierska, K; Xu, J. "Early hypercytokinemia is associated with interferon-induced transmembrane protein-3 dysfunction and predictive of fatal H7N9 infection." *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:769e774.
- Ward, HE; Nicholas, TE. "Alveolar type I and type II cells." *Aust N Z J Med*. 1984; 14(5 Suppl 3):731-4.
- Webster, LT; Clow, .D. "Intranasal virulence of pneumococci for mice." *J. Exp. Med*. 1933; 58:465-483.
- Webster, RG; Bean, WJ; Gorman, OT; Chambers, TM; Kawaoka, Y. "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev*. 1992; 56:152e179.
- Weibel, ER. "A note on differentiation and divisibility of alveolar epithelial cells." *Chest*. 1974; 65:Suppl:19S-21S.
- Weinberger, DM; Harboe, ZB; Viboud, C; Krause, TG; Miller, M; Mølbak, K; Konradsen, HB. "Serotype-specific effect of influenza on adult invasive pneumococcal pneumonia." *J Infect Dis*. 2013; 208(8):1274-80.
- Weinheimer, VK; Becher, A; Tönnies, M; Holland, G; Knepper, J; Bauer TT; Schneider, P; Neudecker, J; Rückert, JC; Szymanski, K; Temmesfeld-Wollbrueck, B; Gruber, AD; Bannert, N; Suttorp, N; Hippenstiel, S; Wolff, T; Hocke, AC. "Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung." *J Infect Dis*. 2012; 206(11):1685-1694.
- Welsch, D. "Lehrbuch Histologie." München, Urban & Fischer. 2010.
- Welte, T; Marre, R; Suttorp, N. "What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?" *Med Klin (Munich)*. 2006; 101(4):313–320.
- Westphalen, K; Gusarova, GA; Islam, MN; Subramanian, M; Cohen, TS; Prince, AS; Bhattacharya, J. "Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity." *Nature*. 2014; 506:503-506.
- WHO. (2003) "Fact sheet N°211." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>.
- WHO. (2014) "Pneumonia Fact sheet N°331" from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>.
- WHO. (2015) "Influenza update 05 October 2015, - Update number 247, based on data up to 20 September 2015" from http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/.
- Wiley, DC; Wilson, IA; Skehel, JJ. "Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation." *Nature* 1981; 289(5796):373-378.

Williams, MC. "Alveolar type I cells: molecular phenotype and development." *Annu Rev Physiol.* 2003; 65:669-95.

Witzenrath, M; Pache, F; Lorenz, D; Koppe, U; Gutbier, B; Tabeling, C; Reppe, K; Meixenberger, K; Dorhoi, A; Ma, J; Holmes, A; Trendelenburg, G; Heimesaat, MM; Bereswill, S; van der Linden, M; Tschopp, J; Mitchell, TJ; Suttorp, N; Opitz, B. "The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia." *J Immunol.* 2011; 187(1):434-40.

Wizemann, TM. Heinrichs, JH; Adamou, JE; Erwin, AL; Kunsch, C; Choi, GH; Barash, SC; Rosen, CA; Masure, HR; Tuomanen, E; Gayle, A; Brewah, YA; Walsh, W; Barren, P; Lathigra, R; Hanson, M; Langermann, S; Johnson, S; Koenig, S. "Use of a whole-genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection." *Infect. Immun.* 2001; 69:1593–1598.

Wolbach, SB. "Comments on the pathology and bacteriology of fatal influenza cases, as observed at Camp Devens, Mass. Bull." *J. Hopkins Hosp.* 1919; 1:104–109.

Wong, MH; Johnson, MD. "Differential Response of Primary Alveolar Type I and Type II Cells to LPS Stimulation." *PLoS One.* 2013; 8(1):e55545.

Wu, W; Zhang, W; Booth, JL. Metcalf, JP. "Influenza A(H1N1)pdm09 virus suppresses RIG-I initiated innate antiviral responses in the human lung." *PLoS One.* 2012; 7(11):e49856.

Wu, W; Zhang, W; Duggan, ES; Booth, JL; Zou, MH; Metcalf, JP. "RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells." *Virology.* 2015; 482:181-8.

Yamamoto, K; Ahyi, AN; Pepper-Cunningham, ZA; Ferrari, JD; Wilson, AA; Jones, MR; Quinton, LJ; Mizgerd, JP. "Roles of Lung Epithelium in Neutrophil Recruitment during Pneumococcal Pneumonia." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014; 50(2):253-62.

Yokoyama, A; Kohno, N; Fujino, S; Hamada, H; Inoue, Y; Fujioka, S; Ishida, S; Hiwada, K. "Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma." *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151(5):1354-8.

Yoshida, M; Ikegami, M; Reed, JA; Chroneos, ZC; Whitsett, JA. "GM-CSF regulates surfactant Protein-A and lipid catabolism by alveolar macrophages." *Am, J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001; 280:L379–L386.

Yoshimura, A; Lien, E; Ingalls, RR; Tuomanen, E; Dziarski, R; Golenbock, D. "Cutting edge: recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2." *J. Immunol.* 1999; 163:1–5.

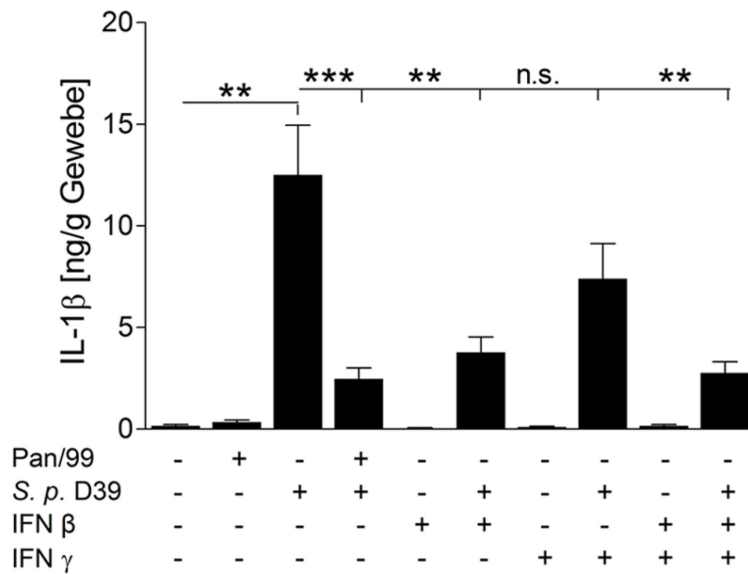
Zhu, X; Yu, W; McBride, R; Li, Y; Chen, LM; Donis, RO; Tong, S; Paulson, JC; Wilson, IA. "Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptorbinding and pH-dependent fusion activities." *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(4):1458-1463.

Zimmermann, T. "Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy." *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 2005; 95:245-265.

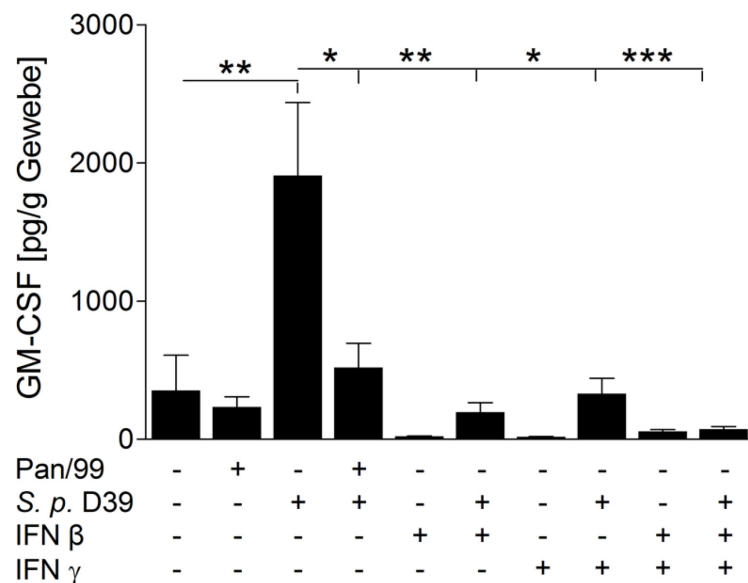
Zou, GM; Tam, YK. "Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances." *Eur Cytokine Netw.* 2002; 13:186-199.

Anhang

A

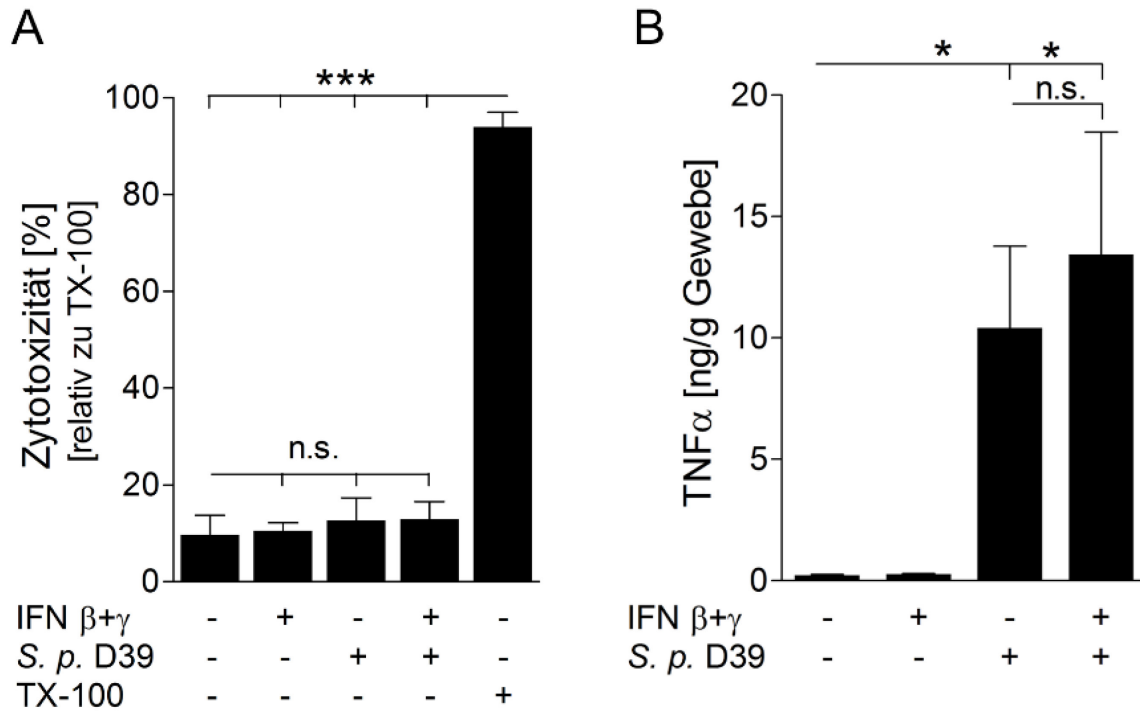


B



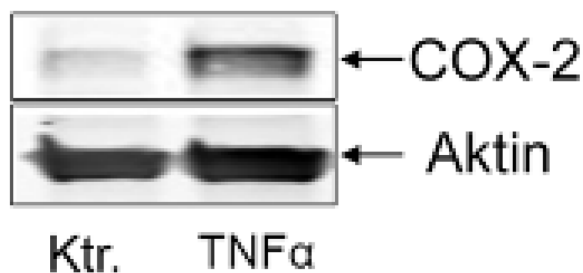
Anhang 1: Einfluss einzelner Interferone auf die *S. pneumoniae* induzierte Bildung von IL-1β und GM-CSF.

Lungenkulturen wurden für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) und darauffolgend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Der nichtinfizierten Kontrolle wurde zu beiden Infektionszeitpunkten, den einzeln infizierten Proben anstelle des jeweils zweiten Erregers Kulturmedium injiziert. Zusätzlich wurden Lungenkulturen für 16 h entweder mit IFNβ (100 U/ml), IFNγ (100 U/ml), einer Kombination IFNβ + IFNγ (je 100 U/ml) bzw. PBS stimuliert und anschließend mit Kulturmedium bzw. *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert. Die Quantifizierung der Sekretion an (A) IL-1β und (B) GM-CSF erfolgte in den Kulturüberständen mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus sieben verschiedenen Patientenproben. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).



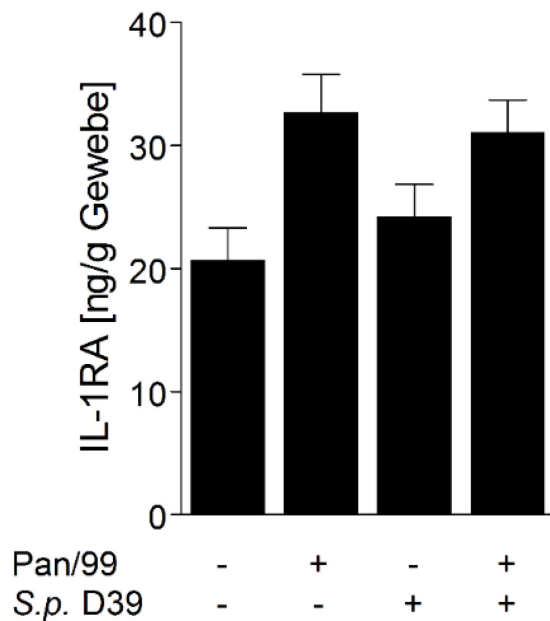
Anhang 2: Keine Beeinflussung der Zytotoxizität durch Interferonstimulation in Lungenkulturen.

Lungenkulturen wurden für 16 h mit einer Kombination aus IFN β + IFN γ (je 100 U/ml) oder PBS stimuliert und anschließend für weitere 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (10^6 cfu/ml) infiziert bzw. entsprechend mit Kulturmedium behandelt. (A) Als Zytotoxizitätsindikator wurde eine weitere Probe für den gesamten Zeitraum in Kulturmedium mit 10 % Triton-X-100 (TX-100) kultiviert. Nach Beendigung der Infektion wurde in den Überständen und Gewebeproben der Gehalt an LDH ermittelt. Die berechnete Zytotoxizität [Zytotoxizität [%] = LDH Aktivität (ÜS)/(LDH Aktivität (Lysat)+LDH Aktivität (ÜS)) x 100] wurde in Relation zur Triton-X-100 Probe dargestellt. (B) Zusätzlich wurde TNF α in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus je drei verschiedenen Patientenproben. (***) $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test).



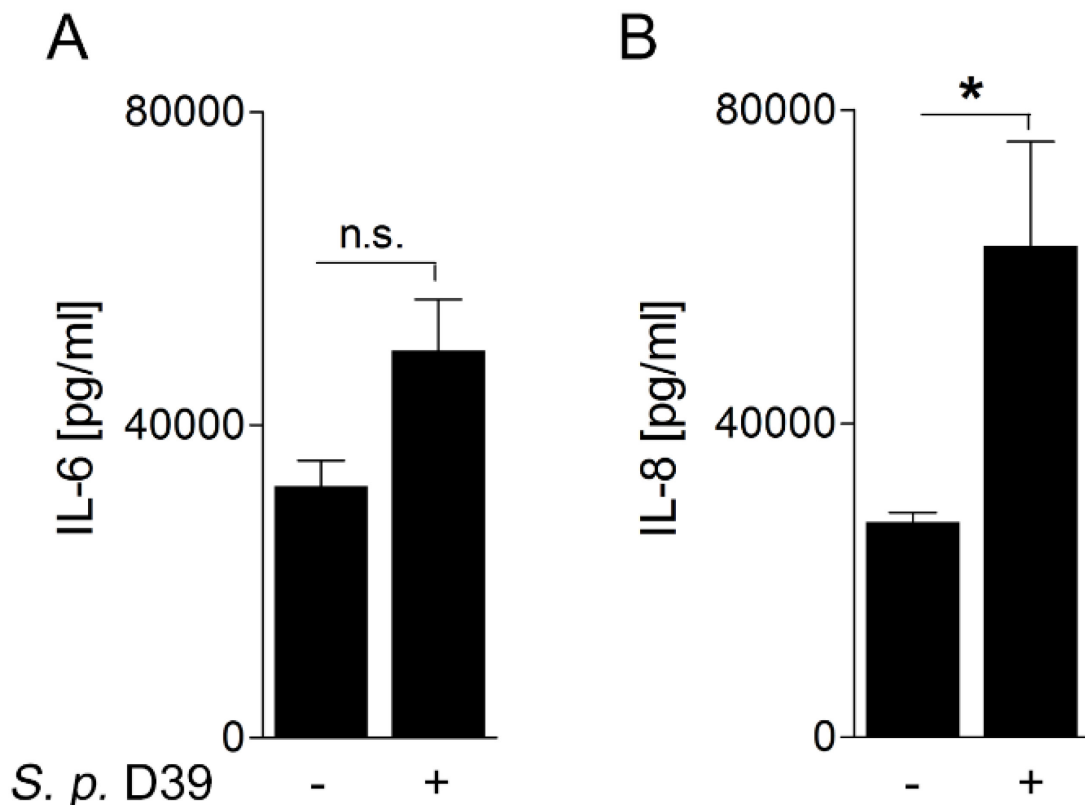
Anhang 3: Injiziertes TNF α induziert die Bildung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in humanen Lungenkulturen.

Lungenstücken wurden für 16 h mit TNF α (100 μ g/ml) stimuliert, das Gewebe homogenisiert und das extrahierte proteinhaltige Lungenlysat im Western Blot auf Bildung der COX-2 untersucht. Es wurden 100 μ g Gesamtprotein geladen, die Detektion erfolgte im Odyssey LI-COR Scanner (Ktr - Kontrolle).



Anhang 4: IAV und *S. pneumoniae* beeinflussen hohe initiale IL-1RA Werte in Lungenkulturen nicht.

Humane Lungenkulturen wurden entweder ausschließlich mit Kulturmedium, einzeln für 24 h mit Pan/99(H3N2) (10^6 pfu) bzw. einzeln mit dem *S. pneumoniae* Stamm D39 (10^6 cfu/ml) oder nacheinander mit beiden Erregern (24 h Pan/99(H3N2)/ 16 h *S. pneumoniae* D39) infiziert. Den mit nur einem Erreger behandelten Kontrollgruppen wurde zu den entsprechenden Zeiten Kulturmedium anstelle des jeweils zweiten Erregers injiziert. Nach Beendigung der Infektion wurde in den Kulturüberständen die Menge an IL-1RA mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm SEM$ aus neun verschiedenen Patientenproben.



Anhang 5: AM sezernieren IL-6 und IL-8 nach Infektion mit *S. pneumoniae*.

AM wurden 3 Tage nach Isolation aus dem humanem Lungengewebe für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 (MOI: 0,5) infiziert. In den Kulturüberständen wurde die Menge an sezerniertem (A) IL-6 und (B) IL-8 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm SEM$ aus je vier verschiedenen Patientenproben. (* $p < 0,01$, Mann-Whitney-Test).

Publikationen

In der Arbeit enthaltene Teile werden publiziert in:

Berg J, Zscheppang K, Tönnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Eggeling S, Schimek M, Gruber AD, Kershaw O, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. (2015) Interferons prevent IL-1 β dependent GM-CSF in post-pneumococcal influenza infection of human lungs (*PNAS*, under revision)

Von dieser Studie unabhängige Publikationen:

Rabes A, Fatykhova D, Machnik C, Prasag G, **Berg J**, Tönnies M, Bauer TT, Schneider P, Schimek M, Eggelin S, Mitchell A, Hain T, Hilker R, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. (2015) Serotype 1 and 8 pneumococci evade sensing by the inflammasome in human lung tissue. *PLoS One*. 10(8):e0137108.

Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, **Berg J**, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, Gutbier B, Opitz B, Neudecker J, Rückert J, Gruber AD, Kershaw O, Mayer K, Suttorp N, Witzenth M. (2015) Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia. *J. Antimicrob Chemother*. 70(3):830-40.

Hocke AC, **Berg J**, Becher A, Knepper J, Klauschen F, Tönnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Gruber AD, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T. (2013) - Reply to Fujino et al.-*J Infect. Dis*. 207(4):693-5.

Cording J, **Berg J**, Käding N, Bellmann C, Tschek C, Westphal JK, Milatz S, Günzel D, Wolburg H, Piontek J, Huber O, Blasig IE (2013) In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci*, 126(Pt 2):554-64.

Vorträge:

PROGRESS Jahrestreffen 07.11. 2014, Berlin

„Influenza-induced epigenetic modifications promoting severe secondary pneumococcal pneumonia“, J. Berg, M. Machnik, A. Becher, T. Bauer, M. Tönnies, J. Neudecker, J.C. Rückert, O. Kershaw, A.D. Gruber, S. Schmeck, N.Suttorp, S. Hippenstiel, A.C. Hocke

DGP, Herbsttagung Sektion Zellbiologie, 14. – 15. 11. 2014, Lübeck

„Type I/II IFNs facilitate development of secondary bacterial pneumonia in human lung tissue“, J. Berg, K. Hellwig, D. Stoll D, A. Becher, T. Wolff, M. Tönnies, T. Bauer, P. Schneider, J. Neudecker, J. C. Rückert, O. Kershaw, A.D. Gruber, N. Suttorp, S. Hippenstiel, A. C. Hocke

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Suttorp für die Möglichkeit bedanken meine Dissertation in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie an der Charité zu Berlin anfertigen zu können.

Prof. Dr. Andreas Hocke und Prof. Dr. Stefan Hippenstiel danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas sowie der exzellenten Betreuung während der Promotion. Die wertvollen Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen haben die Studie stets vorangebracht.

Weiterhin möchte ich den Thoraxchirurgen Dr. Mario Tönnies vom HELIOS Klinikum Emil von Behring, PD Dr. Paul Schneider von den DRK Kliniken Berlin Mitte, PD Dr. Jens Rückert sowie PD Dr. Jens Neudecker aus der Charité Campus Mitte und Dr. Stefan Eggeling sowie Dr. Maria Schimek für die kontinuierliche Bereitstellung von humanem Lungengewebe danken.

Der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Wolff (RKI) danke ich für Bereitstellung des Influenza A Virus A/Panama/1999(H3N2) und für die fachliche Unterstützung. Ebenso danke ich Prof. Dr. Sven Hammerschmidt (Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald) für die Bereitstellung des Pneumokokkenstammes *S. pneumoniae* D39 (NCTC7466) sowie Dr. Mark van der Linden (Nationales Referenzzentrum für Streptokokken, Aachen) für den in der Studie verwendeten *S. pneumoniae* Stamm vom Serotyp 3 (SN35209).

Ebenso gilt mein Dank der gesamten AG von Prof. Achim Gruber (Institut für Tierpathologie, FU Berlin) für die Erstellung der Lungengewebepräparate zur immunhistologischen Analyse.

Weiterer Dank geht an Dr. Frederick Klauschen vom Institut für Pathologie an der Charité Campus Mitte für die Diagnostik und Bearbeitung der Gewebeproben.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Labors bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, welche ich insbesondere in schwierigen Zeiten zu schätzen wusste.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und Freunden danke ich herzlich für die fortlaufende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Von ganzem Herzen danke ich Tobias Reisbach für seine unermüdliche Unterstützung, Motivation und Geduld.